



# BMP9 et BMP10 dans le remodelage vasculaire périnatal

Sandrine Levet

## ► To cite this version:

Sandrine Levet. BMP9 et BMP10 dans le remodelage vasculaire périnatal. Autre. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV037 . tel-01062446

**HAL Id: tel-01062446**

**<https://theses.hal.science/tel-01062446>**

Submitted on 9 Sep 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Sandrine LEVET**

Thèse dirigée par **Sabine BAILLY**

Préparée au sein du **Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **BMP9 et BMP10 dans le remodelage vasculaire périnatal**

**Développement lymphatique,  
Angiogenèse postnatale de la rétine,  
Fermeture du canal artériel et Gestation**

***Etude phénotypique de la souris Bmp9-KO***

Thèse soutenue publiquement le **2 octobre 2013**,  
devant le jury composé de :

**Madame Tatiana PETROVA**

Professeur à l'Université de Lausanne, Rapporteur

**Madame Véronique MAGUER-SATTA**

Directrice de recherche au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,  
Rapporteur

**Madame Véronique GOURNAY**

Professeur au Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, Examinateur

**Madame Sabine BAILLY**

Directrice de recherche au CEA de Grenoble, Directrice

**Monsieur François BOUCHER**

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Président

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /*

*Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*





# Remerciements

---

Je remercie le Professeur T. Petrova, le Docteur V. Maguer-Satta, le Professeur V. Gournay et le Professeur F. Boucher de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie profondément ma directrice de thèse, Sabine Bailly pour ces presque-4-ans partagés, passés à me transmettre tes connaissances et à me façonner scientifiquement. C'est une belle petite équipe que tu fais avancer, dans laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler et que je quitte à regret, mais armée pour de nouvelles aventures... notamment grâce à la contribution de mes 2 « co-directeurs » de cœur, Emmanuelle Tillet et Daniel Vittet qui t'ont secondée dans mon éducation, avec l'aide précieuse de Christine Mallet et de Mariela Subileau.

Je remercie particulièrement le patron Haut-Savoyard du Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection, Jean-Jacques Feige. Avec son exigence et sa burette d'huile, il fait de ce laboratoire un lieu épanouissant scientifiquement et humainement. En incluant naturellement celles du secrétariat, de la laverie et de l'animalerie, merci à toutes les personnes du laboratoire dont la compétence, l'enthousiasme et la gentillesse m'ont permis d'avancer pendant ces années de thèse.

Et quelques pensées supplémentaires...

...Pour ma patronne qui n'a pas dû avoir souvent l'occasion de passer les cellules d'une thésarde coincée dans un trou de neige... Des éducations en cours, d'alpiniste d'un côté, de culture de l'autre, seront l'occasion de trinquer à nos progrès mutuels...

...Pour le bureau des LowTech qui comme son nom ne l'indique pas est celui de mes deux papiers principaux...

...Pour JJ, son sens de l'humour, son toucher de neige et ses précieux conseils en expérimentation animale et notamment sur l'utilisation de ce merveilleux instrument de haute technologie qu'est la guillotine...

...Pour les occupantes du bureau 211A, le mieux décoré, et aussi le plus accueillant... Et pour sa locataire précédente qui m'a légué sa place et sa paillasse...

...Pour l'autre San et les échappées belles des midis, soirs, et WE, sportives et professionnelles...

...Pour Bambi dont les efforts de fermeté sont en train de payer et pour sa présence aux moments cruciaux de la journée et autre...



...Pour les **P**iliers des dégustations du labo, et ces moments de haute œnologie. Un départ au moment où le travail porte ses fruits, à l'entame de l'apprentissage des millésimes, est un vrai crève-cœur...

...Pour les membres du labo croisés chaque jour avec plaisir et leurs aides efficaces et patientes...

...Pour les relecteurs attentifs...

...Pour mes parents et mon frérot...

...Pour mon Homme et toutes les belles courses, voyages et expéditions que l'on a faits et qu'il nous reste à faire...

...Merci à tous pour les instants partagés.

Avec : dans le rôle la patronne, Sabine B., dans celui des occupants du bureau des LowTech, Emmanuelle T. Christine M. et Daniel V., dans celui de JJ, Jean-Jacques F., dans celui des occupantes du 211A, Aude S., Mariela S. et Marie B., dans celui de Bambi, Sophie B., dans celui de l'autre San, Sandrine O., dans le rôle fondamental des Piliers ~~du labo~~, dans celui des doux membres du labo, Agnès C., Delphine C., Nicolas R., Odile C., Claude C., Christine M., Nadia A., Nadia C., Marie-Pierre M., Virginie L., Feli R., Vanessa G., ... , dans celui des relecteurs, Agnès P., Arnaud P., dans le rôle mes parents et de mon frérot, Chris, Christian et Arnaud L. et dans celui de mon Homme, Antoine P.

# Table des matières

---

Liste des figures .....	3
Liste des tableaux.....	5
<b>INTRODUCTION</b> .....	6
Partie 1.....	7
DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CARDIO-VASCULAIRE.....	7
I. Placentation .....	8
II. Développement cardiaque .....	10
III. Développement des artères des arches aortiques.....	11
IV. Le réseau sanguin .....	13
1. Vasculogenèse .....	13
2. Angiogenèse .....	14
3. Le réseau sanguin mature.....	19
V. Lymphangiogenèse .....	23
 Partie 2.....	25
LE RESEAU LYMPHATIQUE .....	25
I. Structure du réseau lymphatique.....	25
II. Développement du réseau lymphatique.....	29
1. Les étapes précoces du développement lymphatique, de E9.5 à E15 .....	29
2. La maturation du réseau lymphatique, à partir de E15 .....	33
3. Formation de la lymphe et flux dans le réseau lymphatique.....	39
III. Les pathologies lymphatiques humaines .....	41
 Partie 3.....	43
DUCTUS ARTERIOSUS .....	43
I. Ontologie, circulation foetale et phylogénie.....	43
II. Données cliniques humaines .....	45
III. Maintenance de l'ouverture in utero.....	46
IV. Mécanisme de fermeture.....	48
1. La fermeture fonctionnelle : .....	48

2. La fermeture anatomique.....	51
V. Les modèles animaux de PDA. ....	55
VI. Les pathologies humaines associées au PDA. ....	60
 Partie 4.....	 62
LA FAMILLE DES BMP .....	62
I. Les ligands.....	63
II. Voies de signalisation.....	65
III. Fonctions .....	75
IV. BMP9 et BMP10.....	80
 <b>OBJECTIFS</b> .....	 87
 <b>RESULTATS</b> .....	 88
I. La maturation lymphatique et le développement des valves .....	88
II. L'angiogenèse postnatale de la rétine .....	92
III. La fermeture du canal artériel .....	95
IV. BMP9 et BMP10 au cours de la gestation .....	98
V. La forme soluble du récepteur ALK1.....	103
 <b>CONCLUSION</b> .....	 110
 <b>PERSPECTIVES</b> .....	 112
 Liste des Abréviations.....	 115
Bibliographie .....	117
Annexe.....	139

## Liste des figures

Figure 1 Schéma d'un Blastocyste. ....	7
Figure 2 Schéma de l'implantation du Blastocyste. ....	8
Figure 3 Schéma du placenta à terme. ....	8
Figure 4 Schéma d'une villosité chorale. ....	9
Figure 5 Représentation schématique du développement cardiaque. ....	10
Figure 6 Le processus de trabéculatation. ....	11
Figure 7 Les artères des arches aortiques. ....	12
Figure 8 Le remodelage des artères des arches aortiques. ....	12
Figure 9 Les étapes de la vasculogénèse. ....	13
Figure 10 L'angiogénèse par intussusception. ....	14
Figure 11 L'angiogénèse par bourgeonnement (1) : Phase d'activation, sélection de la « tip cell » ....	15
Figure 12 L'angiogénèse par bourgeonnement (2) : Phase d'activation, migration de la « tip cell » et prolifération des « stalk cells ». ....	16
Figure 13 L'angiogénèse par bourgeonnement (3) : Phase de maturation. ....	16
Figure 14 La signalisation VEGF. ....	17
Figure 15 Le contrôle du bourgeonnement par la signalisation NOTCH. ....	18
Figure 16 Les effets opposés de ANG-1 et ANG-2 sur TIE2. ....	19
Figure 17 Morphologie des gros vaisseaux sanguins. ....	20
Figure 18 Morphologie des différents types d'endothélium. ....	20
Figure 19 Les origines embryologiques des VSMC. ....	21
Figure 20 Les réseaux vasculaires lymphatiques et sanguins. ....	23
Figure 21 Schéma général du réseau vasculaire de l'embryon. ....	24
Figure 22 Le système lymphatique et son raccordement au réseau veineux. ....	25
Figure 23 Organisation du système lymphatique. ....	26
Figure 24 Structure des capillaires lymphatiques. ....	26
Figure 25 Caractéristiques moléculaires des valves matures. ....	28
Figure 26 Les étapes du développement lymphatique. ....	29
Figure 27 Les étapes précoces du développement lymphatique. ....	30
Figure 28 Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des EC veineuses en EC lymphatiques: COUP-TF2, SOX18 et PROX1. ....	31
Figure 29 Modulation de la signalisation VEGF-C / VEGFR3 dans les étapes précoces du développement lymphatique. ....	32
Figure 30 La séparation des vasculatures sanguine et lymphatique. ....	33
Figure 31 Variation des niveaux d'expression des marqueurs lymphatiques au cours de la maturation des collecteurs. ....	33
Figure 32 Les étapes de la formation d'une valve lymphatique. ....	34
Figure 33 Les mécanismes précoces de la formation des valves. ....	35
Figure 34 Localisation du Ductus Arteriosus (DA) dans la circulation fœtale. ....	43
Figure 35 Le remodelage des artères des arches aortiques. ....	44
Figure 36 Métabolites de l'acide arachidonique (AA). ....	47
Figure 37 La détection de l'O <sub>2</sub> et la sensibilisation au calcium des VSMC du DA. ....	50
Figure 38 Les 2 rôles de PGE <sub>2</sub> dans la physiologie du DA: Vasodilatation et Epaississement. ....	52

Figure 39 Evolution de l'endothélium du DA en fin de développement embryonnaire.....	53
Figure 40 Défaut de différenciation des SMC dans les souris avec une invalidation de <i>Jag1</i> dans les SMC. ....	57
Figure 41 Arbre phylogénétique de la famille TGFβ. ....	62
Figure 42 La maturation des BMPs .....	64
Figure 43 Schéma d'un nœud cystéique.....	64
Figure 44 Activation du TGF-β1 par traction physique.....	65
Figure 45 Voie de signalisation canonique de la famille TGFβ : la voie SMAD.....	68
Figure 46 La signalisation SMAD-indépendante.....	69
Figure 47 Déterminisme des voies de signalisation par le mode d'endocytose. ....	70
Figure 48 Les régulations négatives de la signalisation SMAD.....	74
Figure 49 Les différentes formes de BMP9 et de BMP10 et leur activité.....	80
Figure 50 Structure du complexe ternaire de BMP9, ALK1 <sup>ecd</sup> et ActRIIB <sup>ecd</sup> .....	82
Figure 51 Affinité de BMP9 et de BMP10 pour leurs récepteurs. ....	83
Figure 52 Formes plasmatiques de BMP9 et de BMP10 détectées par dosage biologique et par Elisa. ....	98
Figure 53 Taux de BMP9 et de BMP10 au cours de la gestation murine. ....	99
Figure 54 Expression ARN de BMP10 et de BMP9 dans le placenta au cours de la gestation murine	100
Figure 55 Crâne de nouveau-nés, une heure après leur naissance, après une mise-bas naturelle. ....	101
Figure 56 Schéma du récepteur ALK1 .....	103
Figure 57 Droite d'étalonnage de l'Elisa ALK1.....	104
Figure 58 Dosage de ALK1 soluble dans le plasma humain et dans du milieu conditionné de CE.....	104
Figure 59 Détermination du poids moléculaire de la forme soluble de ALK1 .....	105
Figure 60 Détection de ALK1 soluble dans un modèle de fibroblaste 3T3. ....	106
Figure 61 Détection des formes soluble et intracellulaire de ALK1.....	106
Figure 62 Evolution des taux de sALK1, BMP9 et BMP10 en fonction de l'âge chez la souris.....	107
Figure 63 Schéma de l'implication de BMP9 et de BMP10 dans les remodelages vasculaires périnataux.....	110
Figure 64 Les nouvelles régulations de gènes mises en évidence in vitro en fonction du caractère lymphatique ou sanguin des cellules endothéliales. ....	112

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 Modèles murins impliqués dans la maturation du réseau lymphatique .....	40
Tableau 2 Mutations de gènes associées à des lymphœdèmes chez l'homme.....	41
Tableau 3 Invalidations murines des composants de la voie des prostaglandines et conséquences sur la survenue d'un PDA .....	56
Tableau 4 Invalidations touchant les VSMC du DA et leurs conséquences sur la survenue d'un PDA..	58
Tableau 5 Invalidations variées et leurs conséquences sur la survenue d'un PDA .....	59
Tableau 6 La famille des BMPs .....	63
Tableau 7 Les récepteurs de la famille TGFβ.....	66
Tableau 8 Les interactions démontrées entre les BMPs et leurs récepteurs. ....	67
Tableau 9 Les corécepteurs des BMP et leurs partenaires.....	71
Tableau 10 Pathologies humaines liées à la signalisation BMP. ....	79
Tableau 11 Les protéines régulatrices de l'expression de BMP10. ....	81

# INTRODUCTION

---

La compréhension des remodelages vasculaires est un enjeu important de santé publique. En effet, des modifications des réseaux sanguins et lymphatiques sont impliquées dans de nombreuses situations pathologiques telles que le cancer, le diabète, le psoriasis ou encore l'obésité... La découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques repose en partie sur la compréhension des paramètres physiologiques qui contrôlent l'établissement des réseaux sanguins et lymphatiques. Dans ce contexte, la période périnatale est une période de choix pour l'étude de ces remodelages vasculaires car ils y sont mis en jeu de manière physiologique.

BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) et BMP10 sont deux facteurs de croissance que notre laboratoire a identifiés comme étant les ligands du récepteur ALK1 (Activin receptor-Like Kinase 1) (David et al., 2007a). Ce récepteur est exprimé par les cellules endothéliales (CE) et ses mutations sont responsables de pathologies vasculaires. Cela fait d'ALK1 et de ses ligands des protéines dont il est important de comprendre les différents rôles les remodelages vasculaires. Cette problématique a été abordée dans un contexte de physiologie vasculaire large : le développement lymphatique, l'angiogenèse postnatale de la rétine, la fermeture du canal artériel et la gestation. Ces thèmes de recherche sont reliés entre eux concrètement par la souris invalidée pour *Bmp9*. Cette souris est arrivée dans le laboratoire au début de ma thèse et a constitué le point central de mes recherches. BMP10 a été incluse dans ce travail de recherche car sa proximité avec BMP9 en faisait la candidate de mécanismes compensatoires mis en place en l'absence de BMP9.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est la compréhension des rôles que BMP9 et BMP10 jouent dans les remodelages vasculaires périnataux. Pour cela, quatre grands processus ont été abordés et pour chacun d'entre eux les données *in vivo* collectées chez la souris ont été complétées par des analyses *in vitro*. L'implication de BMP9 et/ou de BMP10 a ainsi été démontrée dans (1) le développement lymphatique, (2) l'angiogenèse postnatale de la rétine, (3) la fermeture du canal artériel et (4) au cours de la gestation. Des résultats ont également été obtenus sur ALK1, le récepteur de BMP9 et de BMP10.

Afin de comprendre l'intérêt de ces résultats, la partie introductive de ce manuscrit présente dans un premier temps la mise en place embryonnaire des systèmes cardio-vasculaires. Dans un second et un troisième temps, le développement du réseau lymphatique et le canal artériel seront détaillés. La famille des BMP, et plus précisément BMP9 et BMP10, sera décrite dans la dernière partie de l'introduction.

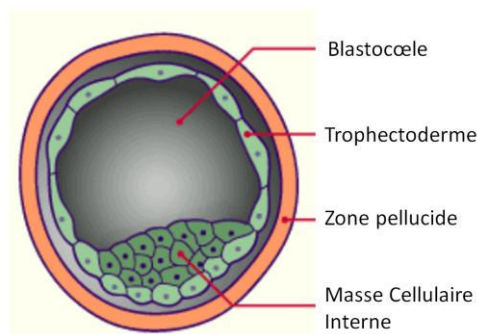
# Partie 1

## DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CARDIO-VASCULAIRE

---

D'une manière générale, ce travail de thèse porte sur les remodelages vasculaires périnataux, conçus comme un ensemble fonctionnel. Le cœur propulse le sang dans l'ensemble du réseau sanguin, y compris le placenta, et les fluides qui s'échappent de ce réseau y sont ramenés via le système lymphatique. Cette première partie d'introduction a pour ambition de resituer ces différentes parties dans un contexte de développement, afin de pouvoir apprécier par la suite des effets que peuvent avoir BMP9 et BMP10 sur ces phénomènes.

Chez les mammifères, la fécondation de l'ovule est suivie de plusieurs divisions cellulaires conduisant l'embryon au stade de la morula (16 à 64 cellules). Jusqu'à ce stade, les cellules sont dites totipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de donner un individu complet et toutes les annexes embryonnaires. La différenciation cellulaire s'amorce à la fin du stade morula et conduit à la formation du blastocyste (Figure 1). Ce stade embryonnaire est caractérisé par la formation d'une cavité interne remplie de liquide, le blastocœle, et de deux zones cellulaires bien distinctes : le trophectoderme et la masse cellulaire interne. Le trophectoderme est composé par les cellules localisées à la surface du blastocyste, les trophoblastes. Ces cellules donneront ensuite les annexes extra-embryonnaires : placenta, amnios, vésicule vitelline et allantoïde. La masse cellulaire interne poursuivra son développement jusqu'à la formation d'un individu complet. L'implantation de l'embryon dans l'endomètre commence au stade blastocyste et c'est à partir de ce stade qu'il devient nécessaire de traiter séparément la placentation et le développement cardiovasculaire du fœtus.



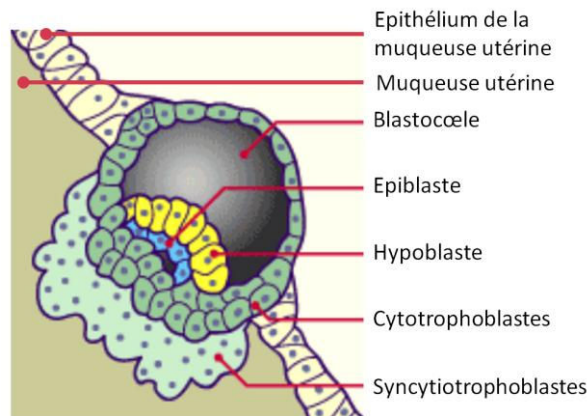
**Figure 1 Schéma d'un Blastocyste.**

Les premières étapes du développement de l'embryon s'effectuent à l'intérieur d'une coque glycoprotéique, la zone pellucide. Schéma adapté de: <http://www.embryology.ch>



## I. Placentation

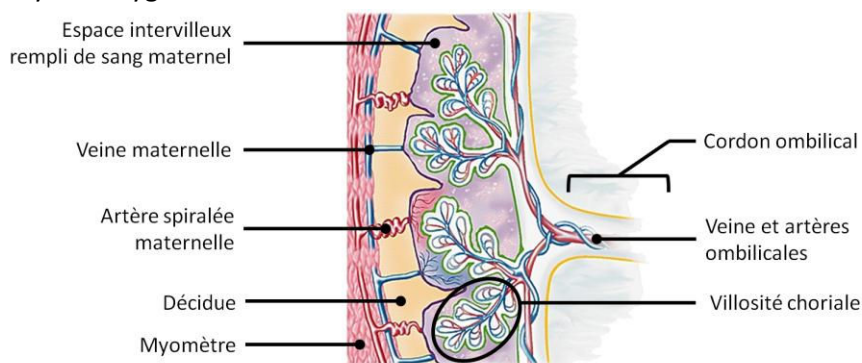
Après 5 jours de développement chez la femme, le blastocyste s'extrait de la zone pellucide et les trophoblastes entrent alors en contact avec l'endomètre qui tapisse la cavité utérine : c'est le début de la placentation (Figure 2).



**Figure 2 Schéma de l'implantation du Blastocyste.**

Après la rupture de la zone pellucide, les cytotrophoblastes prolifèrent et fusionnent au contact de la paroi utérine pour former le syncytiotrophoblaste. Le disque embryonnaire est alors formé de l'hypoblaste et de l'épiblaste. On note l'apparition de la cavité amniotique sous l'épiblaste. Schéma adapté de: <http://www.embryology.ch>

Au contact de la muqueuse utérine, les cytotrophoblastes (CT) (qui dérivent des trophoblastes initiaux) prolifèrent, se différencient et fusionnent pour former le syncytiotrophoblaste (ST). Ces deux types de trophoblastes vont poursuivre leur prolifération tout en érodant progressivement l'endomètre maternel. Cet envahissement s'effectue à la manière d'un enracinement, chaque extrémité de racine constituant une villosité chorale, l'unité structurale et fonctionnelle du placenta (Figure 3, Figure 4). Le réseau sanguin fœtal se développe dans les villosités tandis que l'activité lytique du ST érode l'endomètre et ses les capillaires, créant ainsi des lacunes remplies de sang maternel. Les échanges fœtaux-maternels peuvent alors se mettre en place pour fournir à l'embryon l'oxygène et les nutriments dont il a besoin.

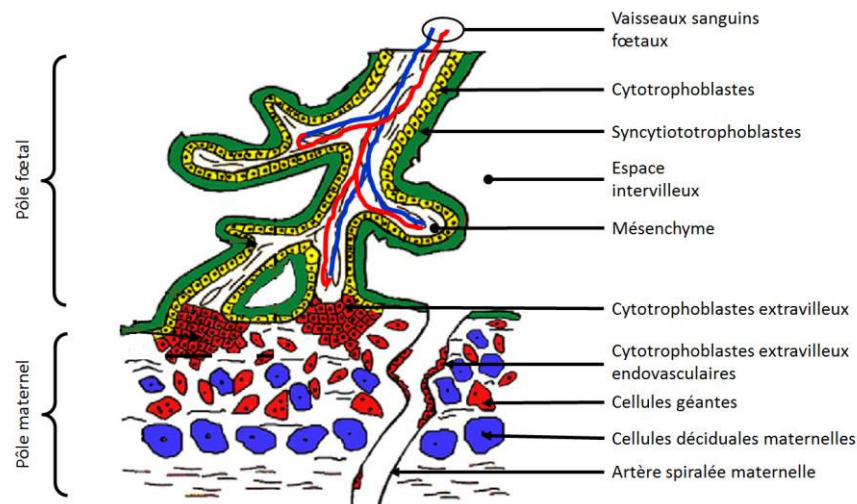


**Figure 3 Schéma du placenta à terme.**

Schéma adapté de: [http://www.larousse.fr/encyclopedie/data/images/1002005-Coupe\\_du\\_placenta.jpg](http://www.larousse.fr/encyclopedie/data/images/1002005-Coupe_du_placenta.jpg)

La couche multinuclée de ST joue le rôle d'unité endocrine du placenta, capable de sécréter des hormones stéroïdes (progestérone et œstrogènes) et des hormones polypeptidiques (human chorionic gonadotropin (hCG), placental growth hormone (PGH)). Ces hormones jouent un rôle déterminant dans le maintien et le développement de la grossesse (Alsati et al., 1999). Les CT se différencient également en un autre type cellulaire : les cytotrophoblastes extra-villoux. Ces CT

extravilleux se différencie dans la partie distale de la villosité chorale, acquièrent un phénotype invasif et envahissent l'endomètre maternel. Cet envahissement se traduit notamment par une migration jusque dans la paroi des artères spiralées utérines pour aller y remplacer les cellules endothéliales (CE) maternelles et permettre ainsi de moduler le débit sanguin dans l'espace intervilloux (Figure 4) (Redman, 1997).



**Figure 4 Schéma d'une villosité chorale.**

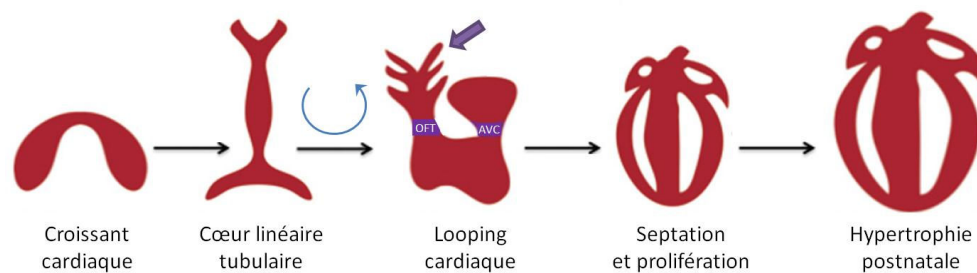
Au cours de leur différenciation terminale, les CT extravilloux peuplent les artères maternelles ou deviennent des cellules géantes (bi ou tri-nucléées). Les couches de CT, de ST, le mésoenchyme de la villosité et les cellules endothéliales des capillaires fœtaux constituent la barrière placentaire. Schéma adapté (Fournier et al., 2007).

La description de la placentation effectuée jusqu'à présent concerne l'espèce humaine. Quelques éléments de comparaison permettent de comprendre les différences qui existent entre les placentas humains et murins. L'analogue des villosités chorales, le site des échanges fœtaux maternels, est appelé labyrinthe chez la souris. La structure de cette zone d'échange est différente : arborisation aux extrémités borgnes chez l'homme, structure labyrinthique beaucoup plus interconnectée chez la souris. Elle est dite hémomonochoriale chez l'humain et hémotrichoriale chez la souris, chez qui 3 couches de trophoblastes sont retrouvées contre la seule couche de syncytiotrophoblaste chez l'humain. Cependant, ces zones d'échanges sont analogues sur le plan fonctionnel. Dans les 2 espèces, la région maternelle bordant la zone des échanges est envahie par des trophoblastes. Cette zone est appelée plaque basale chez l'humain, et spongiotrophoblaste chez la souris. L'envahissement des artères maternelles est plus limité chez la souris (Georgiades et al., 2002). Chez la souris, la durée de gestation est de 19,5 jours, contre 39 semaines chez l'humain.

Cet aperçu du processus de placentation permet de comprendre le développement de la structure qui fournit le fœtus en oxygène et nutriments et lui permet de se développer jusqu'à son terme. Le développement fœtal s'effectue en parallèle de celui du placenta et sera abordé à travers le développement cardiaque et vasculaire. Le développement fœtal qui va maintenant être décrit prendra comme support l'espèce murine. Des exemples chez l'humain seront ponctuellement fournis

## II. Développement cardiaque

Le cœur commence à se former dès le jour embryonnaire 7 (E7) chez la souris et après 3 semaines chez l'homme.



**Figure 5 Représentation schématique du développement cardiaque.**

On note la présence des artères des arches aortiques à l'étape du looping cardiaque (Flèche violette). Le développement de cette structure sera abordé dans le prochain chapitre. Les valves cardiaques se formeront dans les zones de l'OFT (Out Flow Tract) et de l'AVC (Atrio Ventricular Canal). Schéma adapté de (Porrello, 2013).

### *Croissant cardiaque*

Le processus de développement cardiaque débute à E7, après la gastrulation, l'étape du développement permettant de former les 3 feuilletts embryonnaires. Deux zones mésodermiques se distinguent, les « champs cardiaques primaires » (Primary Heart Fields). Les progéniteurs mésodermiques de ces deux régions convergent ensuite pour former à E7.75 le croissant cardiaque, qui correspond à une zone en arc de cercle orientée dans la direction craniale (Figure 5) (Harvey, 2002).

### *Cœur Linéaire*

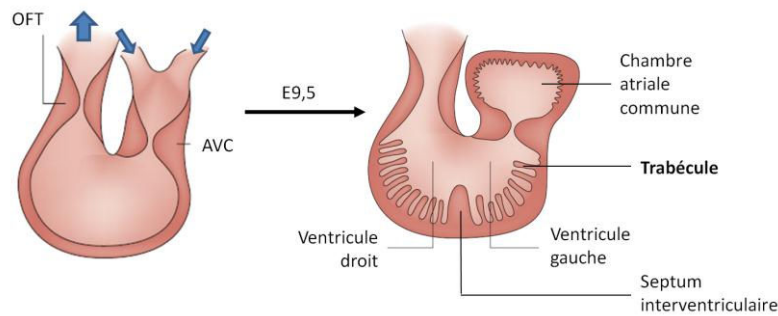
Ces progéniteurs migrent ensuite ventralement pour former un cœur linéaire tubulaire à E8.25. La région d'entrée du flux, la chambre atriale commune, est située du côté caudal du tube. Cette structure tubulaire éphémère est constituée d'une couche interne endothéliale, l'endocarde et d'une couche externe musculaire, le myocardium. La gelée cardiaque constitue la couche intermédiaire entre les 2 précédentes (Harvey, 2002).

### *Looping*

À partir de E9.5 le tube cardiaque linéaire subit une torsion complexe par la droite, le looping cardiaque. Le cœur adopte alors une forme spiralée, la partie atriale commune prenant une position cranio-dorsale. On passe alors d'un motif antéro-postérieur (avec le pôle veineux postérieur et le pôle artériel antérieur) à un motif gauche-droit.

### *Trabéculatation*

Au cours du processus de torsion, la partie interne des ventricules devient de plus en plus complexe : c'est la trabéculatation (Figure 6). Les trabécules correspondent à des feuilletts de cardiomyocytes formant des crêtes à l'intérieur des cavités cardiaques. Ces crêtes sont entourées d'une couche de cellules endocardiales. Une des fonctions primaire des trabécules est d'augmenter la masse myocardiale en absence de circulation coronaire (Moorman and Christoffels, 2003).



**Figure 6 Le processus de trabéculatation.**

Les flèches bleues représentent le sens de circulation du sang dans le cœur embryonnaire. La trabéculatation se déroule également dans les oreillettes. Schéma adapté de (High and Epstein, 2008).

### ***Coussins endocardiaux et septation***

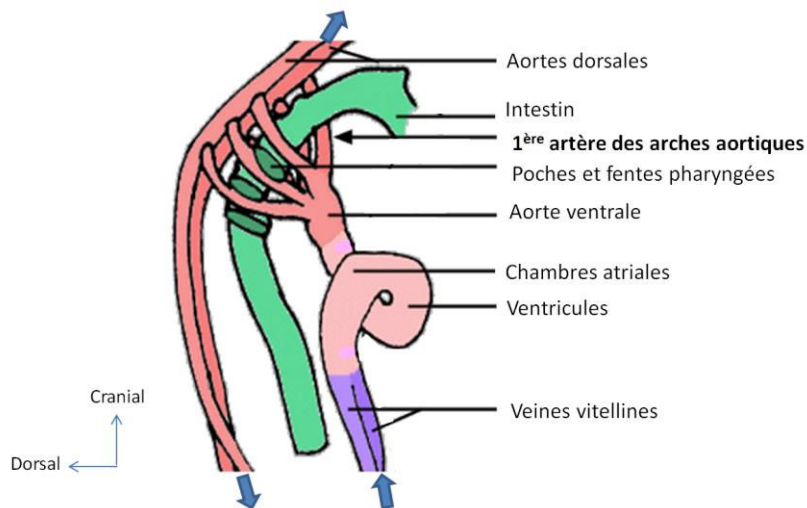
La région du canal atrio-ventriculaire (AVC) s'épaissit également : c'est la formation des coussins endocardiaux ou « endocardial cushions ». Cette zone de l'AVC donnera plus tard les valves mitrale et tricuspide. Une seconde zone d'épaississement est également présente à la sortie du cœur, dans l'OFT (Outflow tract), elle conduira à la formation des valves aortiques et pulmonaires, ainsi qu'au septum aortico-pulmonaire. A E10.5, les 4 chambres du cœur sont définies, et à E14.5, la séparation des chambres s'est effectuée, de même que celle de l'OFT, qui se sépare en 2 : tronc pulmonaire et aorte (High and Epstein, 2008).

### ***Epicardium***

A E9.5, un 3<sup>ème</sup> tissu cardiaque se développe, c'est l'épicardium. A E11, les cellules épicaudiales recouvrent complètement le myocardium et se différencient en différents lignages, permettant notamment la formation des coronaires (Epstein, 2010).

## **III. Développement des artères des arches aortiques**

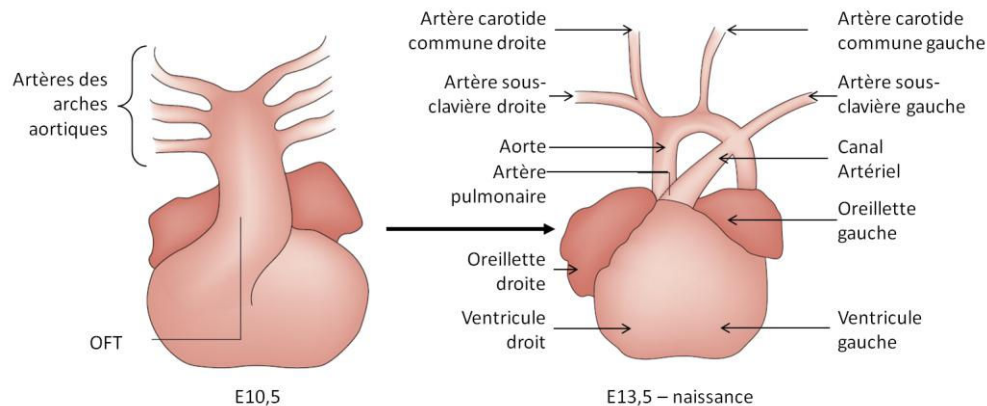
La région de l'OFT est à l'origine composée d'un seul vaisseau qui se sépare ensuite en un ensemble d'artères symétriques, les artères des arches aortiques. Il en existe 6 paires, mais qui ne sont pas toutes présentes au même moment du développement. Ces artères se branchent dorsalement sur chacune des 2 aortes dorsales qui distribuent ensuite le sang dans l'ensemble de l'embryon (Figure 7). Les cellules de la crête neurale vont migrer et peupler les parois des artères des arches aortiques et se différencier en cellules de muscle lisse (SMC, Smooth Muscle cells) (High and Epstein, 2008).



**Figure 7 Les artères des arches aortiques.**

Les artères des arches aortiques permettent de relier l'aorte ventrale, située à la sortie du cœur, aux deux aortes dorsales symétriques. Les flèches bleues représentent le sens de circulation du sang. Les artères des arches aortiques sont une composante de l'appareil pharyngé, une structure complexe qui donnera par la suite les muscles squelettiques, les os, les nerfs et les vaisseaux de la face et du cou principalement. Schéma adapté de: <http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/210labs/arch1.html>

Au cours du développement, les artères des arches aortiques subissent un remodelage complexe, de la symétrie vers l'asymétrie, qui va donner naissance aux gros vaisseaux de la sortie du cœur tels qu'ils sont présents à l'âge adulte (Figure 8).



**Figure 8 Le remodelage des artères des arches aortiques.**

Entre E10,5 et E13,5 les artères des arches aortiques subissent un processus de remodelage complexe aboutissant à la formation des gros vaisseaux. On note que de E13,5 à la naissance, l'artère pulmonaire est directement reliée à l'aorte par le canal artériel. Cette structure, qui se ferme à la naissance, sera développée dans la 3<sup>ème</sup> partie de cette introduction. Schéma adapté de (High and Epstein, 2008).

A ce point de l'introduction, 3 processus développementaux ont été abordés : (1) la placentation, avec le développement des villosités chorionales où ont lieu l'oxygénation et l'apport en nutriments ; (2) le développement cardiaque, la pompe sanguine ; et (3) la formation des artères des arches aortiques qui connectent le cœur aux aortes dorsales. Le développement du réseau sanguin, qui se fait de manière concomitante aux autres processus, permet de relier ces différents éléments. Sa description permettra d'avoir une vision globale et fonctionnelle du système cardiovasculaire embryonnaire.

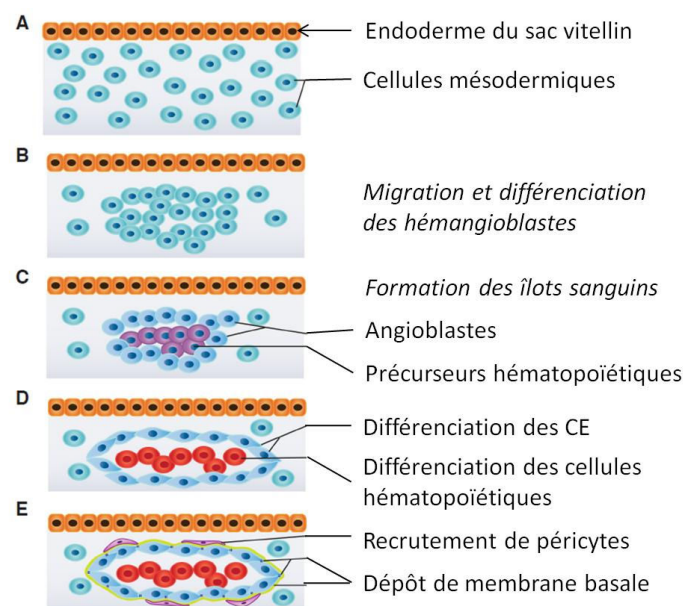
## IV. Le réseau sanguin

La vasculogenèse correspond à la mise en place *de novo* d'un plexus vasculaire primitif à partir de progéniteurs nommés hémangioblastes. La croissance et l'organisation de ce plexus en un réseau vasculaire fonctionnel constitue l'angiogenèse.

### 1. Vasculogenèse

Le développement du système circulatoire commence dès la fin de la gastrulation et à cette étape précoce, seul le processus de vasculogenèse est impliqué. Il se déroule à la fois dans des sites intra-embryonnaires (mésoderme embryonnaire) et extra-embryonnaires (sac vitellin, allantoïde et placenta) (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

Dans le sac vitellin murin, les cellules primitives du mésoderme migrent, se différencient et s'associent en « îlots sanguins » dès E6.5/E7 (Figure 9, A,B,C). Dans les îlots sanguins, les cellules périphériques, nommées angioblastes, vont se différencier ultérieurement en cellules endothéliales, tandis que les cellules du centre vont devenir des précurseurs hématopoïétiques. (Figure 9, D,E). Les aortes dorsale et ventrale et les veines cardinales se forment ensuite par coalescence ou migration des angioblastes à partir de ces « îlots sanguins ». A E8, les vasculatures intra- et extra-embryonnaires se sont anastomosées et le plexus primaire s'est connecté au tube cardiaque (Patel-Hett and D'Amore, 2011).



**Figure 9 Les étapes de la vasculogenèse.**  
Schéma (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

La famille des FGF (Fibroblasts growth Factor), et notamment FGF-2, est impliquée dans l'induction des angioblastes à partir du mésoderme (Cox and Poole, 2000). Ce sont des facteurs de croissance qui agissent via des récepteurs FGF tyrosine kinases. La famille de morphogènes Hedgehog est aussi impliquée dans de nombreuses étapes du développement de la vasculature. La formation des îlots sanguins dans le sac vitellin requiert en particulier l'activation de IHH (Indian Hedgehog). La voie canonique des protéines Hedgehog passe par leur liaison au récepteur PTCH (Patched), ce qui va permettre la translocation nucléaire du facteur de transcription GLI, via l'activation de SMO (Smoothened) (Dyer et al., 2001). Sous l'action de facteurs de croissance, comme



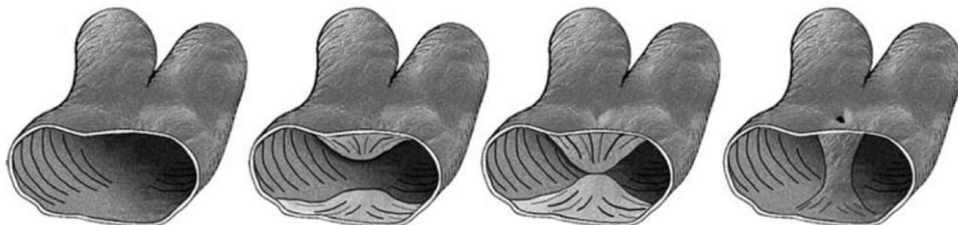
le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), les angioblastes vont ensuite migrer et entraîner la fusion des îlots sanguins, créant ainsi le plexus vasculaire primitif. Les neuropilines (NRP), des co-récepteurs des récepteurs du VEGF, sont également impliquées dans la vasculogenèse, puisque les souris invalidées pour NRP1 et NRP2 ne développent pas de plexus vasculaire primaire (Takashima et al., 2002). La signalisation VEGF sera précisée dans le paragraphe suivant consacré à l'angiogenèse. La famille TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) est aussi impliquée dans le processus de vasculogenèse, et en particulier le ligand TGF $\beta$ 1 et le récepteur TGF $\beta$ 2 (Goumans and Mummery, 2000) (Larsson et al., 2001) (Oshima et al., 1996). Ces facteurs de croissance seront détaillés dans un prochain paragraphe dédié aux principaux facteurs de l'angiogenèse.

## 2. Angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du plexus vasculaire primitif ou à partir de vaisseaux sanguins préexistants. L'angiogenèse est très active au cours de la période périnatale, mais elle est quiescente chez l'adulte. Le cycle menstruel et la gestation constituent des exemples de réactivation physiologique de l'angiogenèse au cours de l'âge adulte. Cette réactivation a également lieu dans des situations pathologiques, telles que les cancers, la rétinopathie diabétique ou la polyarthrite rhumatoïde.

### a. Description de l'angiogenèse

L'angiogenèse peut s'effectuer selon au moins 2 processus : le bourgeonnement et l'intussusception. Lors de l'angiogenèse par intussusception, le vaisseau primitif se divise de façon longitudinale : les cellules endothéliales s'invaginent dans la lumière et vont former un cloison donnant naissance à 2 néo-vaisseaux (Figure 10). Ce type d'angiogenèse est très important dans le remodelage vasculaire pulmonaire qui se produit dans les deux ans après la naissance chez l'homme (Makanya et al., 2009).



**Figure 10 L'angiogenèse par intussusception.**

Les invaginations de la paroi fusionnent pour former un pilier transluminal. Ce processus se répète alors que la séparation des 2 néo-vaisseaux progresse. D'après (Makanya et al., 2009).

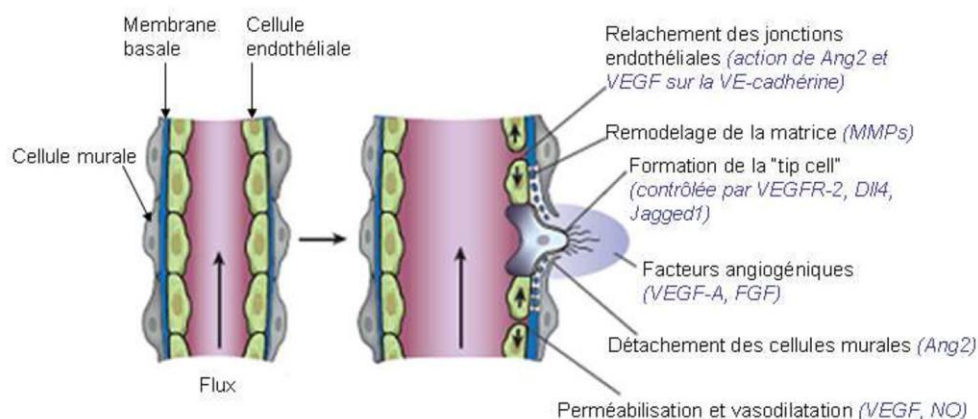
L'angiogenèse par bourgeonnement consiste en la formation et l'élongation d'un bourgeon sur un vaisseau sanguin préexistant. Elle se déroule en 2 phases : la phase d'activation et la phase de maturation. Lors de l'activation, on observe la déstabilisation du vaisseau préexistant par dégradation de la membrane basale, une vasodilatation, puis une prolifération et une migration des cellules endothéliales. La stabilisation des structures vasculaires nouvellement formées correspond à la phase de maturation. C'est ce type d'angiogenèse qui est le plus courant et le plus documenté, et qui sera pour ces raisons traité dans la suite de cette introduction. Les principaux facteurs angiogéniques seront détaillés dans le paragraphe suivant. Dans la description des 2 phases de l'angiogenèse, seuls seront présentés les acteurs majeurs de ces processus, bien que d'autres existent.

### Phase d'activation

Au cours de la phase d'activation, parmi les cellules quiescentes de la paroi du vaisseau (« stalk cells » ou cellules de tige), l'une va prendre la tête du nouveau vaisseau : il s'agit de la « tip cell » ou cellule de l'extrémité (Figure 11). Les dénominations anglaises « tip cell » et « stalk cell » étant largement admises en français scientifique, elles seront utilisées dans la suite de cette introduction, entre guillemets.

La phase d'activation s'initie en réponse au VEGF : la perméabilité vasculaire augmente par redistribution des molécules d'adhésion inter-cellulaires PECAM (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule) et VE-cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin). Les vaisseaux se dilatent en réponse au NO (oxyde nitrique) (Carmeliet, 2000).

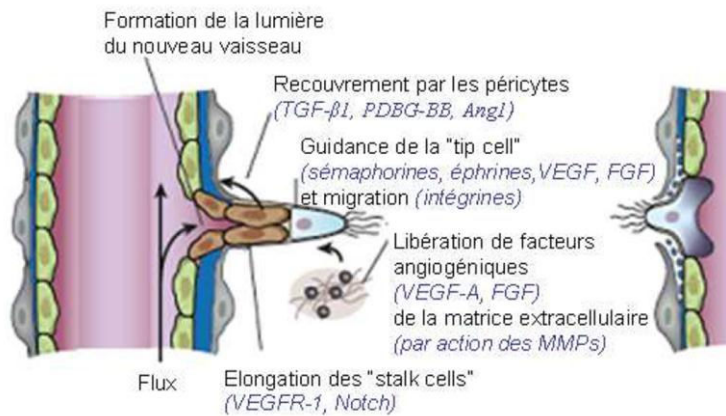
On observe ensuite la perte de contact entre les cellules murales et les cellules endothéliales sous l'action de l'angiopoïétine-2 (Ang-2) sur le récepteur Tie-2 (Maisonpierre et al., 1997). La sécrétion de métalloprotéases (MMPs) induit une dégradation locale de la matrice extracellulaire (MEC) et de la membrane basale. Les MMPs clivent différents composés de la MEC (matrice extracellulaire) : laminine, fibronectine, élastine, collagène. D'autres protéases interviennent également, comme les collagénases de type IV ou V, ou encore l'activateur du plasminogène. Cette dégradation permet non seulement de créer un espace pour les cellules endothéliales migrantes mais aussi de libérer des facteurs de croissance comme le FGF-2 ou le VEGF (Arroyo and Iruela-Arispe, 2010).



**Figure 11 L'angiogenèse par bourgeonnement (1) : Phase d'activation, sélection de la « tip cell »**  
Les principaux facteurs impliqués sont indiqués en bleu. D'après (Carmeliet and Jain, 2011).

La détermination de la « tip cell », nécessite l'induction de l'expression de DLL4 (Delta-like 4) en réponse au VEGF-A (Figure 11, Figure 15). En remontant le gradient des facteurs proangiogéniques les « tip cells » migrent vers l'espace péri-vasculaire où elles prolifèrent et s'associent pour former un néo-vaisseau (Figure 12) (Ruhrberg et al., 2002) (Gerhardt et al., 2003). La MEC joue un rôle primordial au cours de cette étape par l'intermédiaire des intégrines qui facilitent la migration des cellules endothéliales (Hood and Cheresh, 2002). Plusieurs études montrent une implication des facteurs de guidance neuronaux (dont les sémaphorines et les éphrines) dans l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005). La migration des cellules endothéliales cesse lorsque le bourgeon s'anastomose avec un vaisseau existant. Les macrophages jouent un rôle important dans cette anastomose (Fantin et al., 2010).



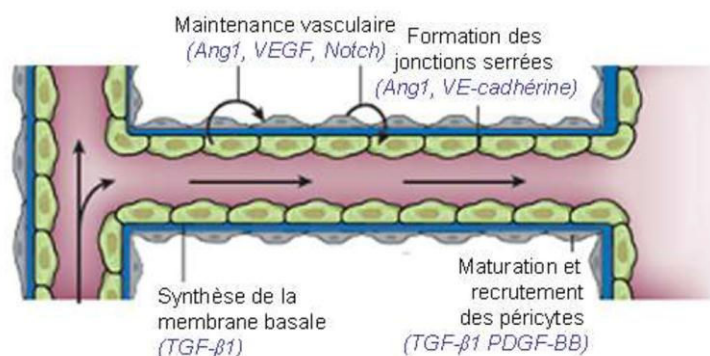


**Figure 12 L'angiogenèse par bourgeonnement (2) : Phase d'activation, migration de la « tip cell » et prolifération des « stalk cells »**  
(Carmeliet and Jain, 2011)

### Phase de maturation

La première étape de la maturation du vaisseau est l'arrêt de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales avec la sécrétion de la MEC. La synthèse d'une nouvelle MEC est induite par le TGF- $\beta$ 1, via son récepteur ALK5, sur les cellules endothéliales et les fibroblastes (Roberts and Sporn, 1989) (Krummel et al., 1988). Les jonctions endothéliales sont alors resserrées grâce à l'action de l'Ang-1 (Figure 13) (Thurston G. 2000). Notre laboratoire a identifié un nouvel acteur de la phase de maturation, BMP9, qui inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales via le récepteur ALK1 (David et al., 2007a).

Une étape cruciale lors de la maturation est le recouvrement des cellules endothéliales par les cellules murales. En effet, les vaisseaux non recouverts par ces cellules sont dégradés (Benjamin et al., 1998). Les cellules mésenchymateuses précurseurs des cellules murales sont recrutées par le PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor BB) (Hellstrom et al., 1999) (Hellstrom et al., 2001). La différenciation de ces précurseurs en cellules de muscle lisse ou en péricytes est induite par le TGF- $\beta$ 1 sécrété par les cellules endothéliales (Figure 12, Figure 13) (Darland and D'Amore, 2001) (Hirschi et al., 1998).



**Figure 13 L'angiogenèse par bourgeonnement (3) : Phase de maturation**  
(Carmeliet and Jain, 2011)

## b. Les principaux facteurs de l'angiogenèse

### La famille du VEGF

La famille du VEGF, des glycoprotéines dimériques, comporte 7 membres, sans compter les variants d'épissage : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et le Placental Growth Factor (PLGF). Trois récepteurs à activité tyrosine kinase sont impliqués dans la signalisation: FLT1 (VEGF-R1), FLK1 (VEGF-R2) et FLT4 (VEGF-R3) (Figure 14).

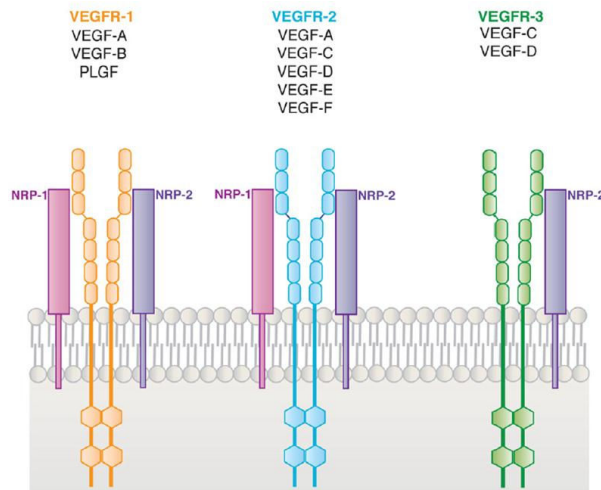


Figure 14 La signalisation VEGF.

Les associations possibles entre les ligands, les récepteurs et corécepteurs de la signalisation VEGF.  
(Patel-Hett and D'Amore, 2011)

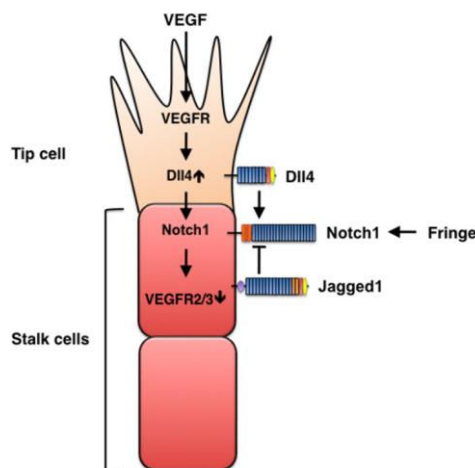
Les différents ligands de la famille du VEGF ne lient pas tous les récepteurs (Figure 14). Ainsi, VEGF-A, le principal facteur angiogénique, lie VEGFR-1 et VEGFR-2 (de Vries et al., 1992) (Terman et al., 1992), mais ne lie pas VEGFR-3. Ce dernier est exprimé principalement dans le compartiment lymphatique et lie VEGF-C et VEGF-D et est impliqué dans la lymphangiogenèse (Taipale et al., 1999). Certains vaisseaux sanguins expriment aussi VEGFR-3, notamment au cours du développement embryonnaire et de la croissance tumorale (Kaipainen et al., 1995) (Clarijs et al., 2002). VEGF-C est aussi pro-angiogénique via VEGFR-2 dans l'embryon murin (Joukov et al., 1996). La liaison des ligands sur les récepteurs entraîne une homo- ou une hétéro-dimérisation, ce qui active l'activité tyrosine kinase du récepteur et déclenche une cascade de signalisation. Les récepteurs possèdent eux-mêmes de nombreuses tyrosines dont la phosphorylation modifie leur activité kinase ou permet le recrutement d'autres voies de signalisation (Kendall et al., 1999) (Takahashi et al., 2001).

Les neuropilines (NRP), des glycoprotéines transmembranaires avec un court domaine transmembranaire dépourvu d'activité kinase, sont des corécepteurs des récepteurs VEGF. La NRP1 est exprimée par l'endothélium artériel, tandis que l'expression de la NRP2 est restreinte aux endothéliums veineux et lymphatiques. On note que la signalisation NRP peut avoir lieu également en association avec les Plexines, des récepteurs transmembranaires dont les ligands sont les Semaphorines (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

### La voie Notch

La voie NOTCH joue un rôle primordial dans le contrôle du bourgeonnement vasculaire. Comme décrit précédemment, la stimulation par le VEGF-A d'une cellule endothéliale induit son bourgeonnement. Afin de limiter le nombre de cellules en bourgeonnement, VEGF-A induit DLL4,

ligand transmembranaire de la voie NOTCH. DLL4 se lie alors sur son récepteur NOTCH1 exprimé par les cellules adjacentes ce qui entraîne le clivage intracellulaire de NOTCH1 par la  $\gamma$ -sécrétase (Nichols et al., 2007) (Hellstrom et al., 2007). La partie intracellulaire du récepteur, appelé NICD pour Notch IntraCellular Domain, est alors libérée et est responsable des effets transcriptionnels, et notamment de la régulation négative de VEGFR-2. Les cellules adjacentes de la « tip cell » deviennent ainsi insensibles au VEGF-A. DLL4 est très exprimé dans les "tip cells" et une régulation négative de *DLL4* augmente le bourgeonnement endothélial (Hellstrom et al., 2007). JAG1 (JAGGED1), un autre ligand transmembranaire de Notch1, est au contraire exprimé par les "stalk cells". JAG1 lie NOTCH1 sans induire la signalisation NOTCH. Les effets de JAG1 sont opposés à ceux de DLL4, JAG1 étant un régulateur positif du bourgeonnement endothélial (Benedito et al., 2009).



**Figure 15 Le contrôle du bourgeonnement par la signalisation NOTCH.**

L'activation de NOTCH1 dans les « stalk cells » réduit leur sensibilité au VEGF, ce qui supprime le phénotype « tip cell ». JAG1 exerce des effets opposés. Les effets antagonistes de ces 2 ligands de NOTCH1 sont modulés par FRINGE, une glycosyltransférase qui effectue des régulations post-traductionnelles de NOTCH1. (Kume, 2009)

### **Les angiopoïétines et leurs récepteurs TIE**

Cette famille se compose de 2 récepteurs à activité tyrosine kinase : TIE-1 et TIE-2 et quatre ligands ANG (ANG-1- ANG-4) (Gale and Yancopoulos, 1999). ANG-1 a été identifié comme agoniste du récepteur TIE2 en 1996 par l'équipe de Yancopoulos (Davis et al., 1996). ANG-1 induit l'autophosphorylation de TIE2, ce qui conduit à l'activation de la PI3K, puis à la phosphorylation et à l'activation de la protéine kinase Akt. Cette protéine induit la survie et la quiescence des cellules endothéliales (Fiedler et al., 2006)

Lors de l'activation de l'angiogenèse par le VEGF ou suite à une hypoxie, les cellules endothéliales sécrètent Ang2. L'équipe de Yancopoulos a montré qu'ANG-2 est un antagoniste du récepteur TIE2, ce qui entraîne un relâchement des jonctions intercellulaires (Maisonpierre et al., 1997). Lors de la phase de maturation, l'arrêt de la sécrétion D'ANG-2 permet le rétablissement de la voie ANG-1/TIE2 et ainsi le resserrement des jonctions intercellulaires et la quiescence de l'endothélium (Figure 16) (Thurston et al., 2000).

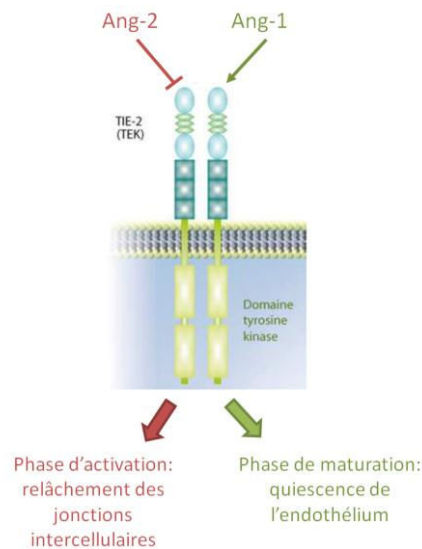


Figure 16 Les effets opposés de ANG-1 et ANG-2 sur TIE2.

D'après JJ feige 2009

### Le PDGF, Platelet Derived Growth Factor

On compte quatre gènes (*PDGF-A* à *D*) qui codent pour cette famille de facteurs de croissance. Ces facteurs sont fonctionnels sous formes dimériques (homo ou hétérodimères) et ont des séquences proches de celle du VEGF (Andrae et al., 2008). Le dimère PDGF-BB est important dans l'angiogenèse puisqu'il est sécrété par les cellules endothéliales et se fixe sur le récepteur PDGF- $\beta$  (un des deux récepteurs au PDGF) que les cellules murales expriment. Ce récepteur possède une activité tyrosine kinase. Le PDGF stimule la prolifération des cellules de muscle lisse et des péricytes (D'Amore and Smith, 1993), et augmente la stabilité de la paroi vasculaire en attirant ces cellules murales vers les néovaisseaux et en les accolant (Hellstrom et al., 1999).

### La famille TGF- $\beta$

Cette famille de plus de 30 membres est principalement impliquée dans la phase de maturation de l'angiogenèse. Le rôle de ces protéines sera détaillé dans le dernier chapitre de cette introduction.

## 3. Le réseau sanguin mature

A la fin de l'angiogenèse, les vaisseaux sanguins matures sont tapissés d'une monocouche de cellules endothéliales entourée d'une épaisse lame élastique interne, ce qui forme un ensemble fonctionnel nommé **intima**. L'intima est entourée par un ou des anneaux de cellules de muscle lisse (veines/artères), ou par un anneau de péricytes (capillaires), contenant des fibres réticulées (collagène III, élastine). Cette seconde couche fonctionnelle forme la **média**. La couche la plus externe s'appelle l'**adventice** et est formée de tissu conjonctif, de fibres de collagène et de fibres élastiques, elle n'est présente que sur les gros vaisseaux. Cette couche peut contenir des petits vaisseaux sanguins, les *vasa vasorum*, qui permettent l'approvisionnement en oxygène et nutriments des couches profondes de la paroi (Figure 17).

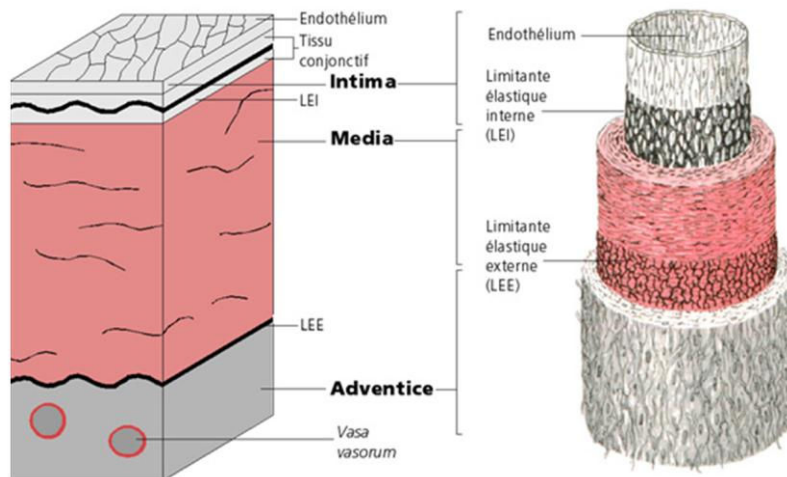


Figure 17 Morphologie des gros vaisseaux sanguins  
<http://www.123bio.net/revues/jleoni/1chap2.html>

### a. L'endothélium

Les endothéliums des différents vaisseaux (artères/artérioles/capillaires/veinules/veines) se distinguent morphologiquement, dans leurs composantes moléculaires et dans leurs fonctions. De plus, l'endothélium des capillaires est hétérogène en fonction de l'organe. Trois types d'endothélium se différencient (Figure 18). Les capillaires possédant un **endothélium continu** ne présentent aucune ouverture dans leur paroi et sont intégralement bordés par le corps de la CE. Au contraire, les **endothéliums fenêtrés** présentent de petites ouvertures couvertes par un diaphragme non-membraneux perméable aux macromolécules. La membrane basale des CE recouvre également les ouvertures. Quant aux **endothéliums discontinus ou sinusoides**, leurs larges fenestrations ne sont recouvertes ni d'un diaphragme, ni d'une membrane basale (Figure 18) (Cleaver and Melton, 2003).

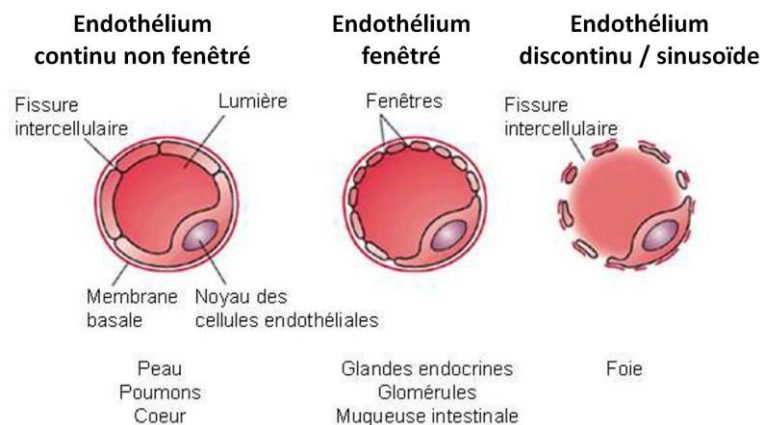


Figure 18 Morphologie des différents types d'endothélium.  
 D'après (Cleaver and Melton, 2003)

La fenestration des capillaires, qui régule les échanges d'eau, de solutés et de molécules, est hétérogène dans l'organisme. Dans la peau, les poumons et le cœur, l'endothélium est continu non fenêtré. L'eau et les solutés passent entre les cellules endothéliales, tandis que les grosses molécules passent par transcytose ou par des canaux transendothéliaux. Dans les glandes endocrines, les glomérules rénaux et la muqueuse gastrointestinale, l'endothélium est continu fenêtré. L'eau et les solutés passent alors plus facilement que dans l'endothélium non fenêtré, mais les plus grosses molécules passent aussi par transcytose ou par les canaux. Enfin, les endothéliums discontinus ne se

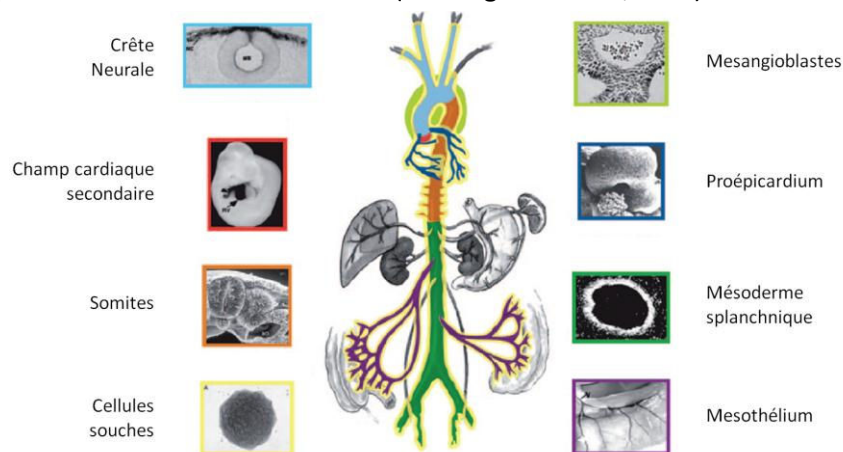
retrouvent que dans des tissus très spécialisés tels le foie, la rate et la moelle osseuse. Ce type d'endothélium permet aux grosses molécules et à des cellules de passer facilement au travers de ses perforations (Pugsley and Tabrizchi, 2000) (Aird, 2007). Notons pour terminer que dans le cerveau l'endothélium (continu non fenêtré) est associé à des astrocytes qui régulent fortement l'endocytose et la transcytose, formant ainsi la barrière hémato-encéphalique (Cleaver and Melton, 2003).

L'identité artérielle ou veineuse des cellules endothéliales est en partie génétique. La Neuropiline 1 (NRP1), qui est un co-récepteur du VEGF, est exprimée spécifiquement dans les artères, tandis que la Neuropiline 2 (NRP2), est un marqueur veineux. Avant l'établissement de toute circulation sanguine, les îlots sanguins expriment spécifiquement l'un ou l'autre de ces marqueurs en fonction de leur devenir (Herzog et al., 2005). Un couple très étudié est celui que le récepteur EPHB4 forme avec son ligand Ephrin-B2. EPHB4 est spécifiquement exprimé dans les veines, tandis que EphrinB2 est exprimé dans les artères, et ce avant la circulation du sang (Gerety et al., 1999).

Le flux participe également à la détermination de la nature artérielle ou veineuse de l'endothélium comme le montre l'acquisition progressive du phénotype artériel par des veines greffées à la place d'artères (Moyon et al., 2001) (Kwei et al., 2004).

## b. Les cellules de muscle lisse vasculaire

Les cellules de muscle lisse vasculaires (VSMC : vascular smooth muscle cells) possèdent des origines embryologiques diverses (Figure 19). La plupart proviennent du mésoderme local. Mais les VSMC des grosses artères peuvent provenir d'autres origines. En particulier, les VSMC des vaisseaux coronaires proviennent de l'organe proépicaudal, celles de la crosse de l'aorte et des vaisseaux de la tête et du cou proviennent de la crête neurale (Cheung and Sinha, 2011).



**Figure 19 Les origines embryologiques des VSMC.**

Les différentes couleurs des artères correspondent aux origines embryologiques des VSMC indiquées de chaque côté du schéma. D'après (Majesky, 2007)

Les VSMC sont traditionnellement regroupées en deux groupes : les VSMC « contractiles », quiescentes et en forme de fuseau ; et les VSMC « synthétiques », aux propriétés migratoires et prolifératives. Les caractéristiques de ces 2 groupes ne sont cependant pas complètement exclusives. La modulation phénotypique des VSMC est déterminée par des stimuli mécaniques et/ou chimiques. Les voies NOTCH et Wnt jouent des rôles importants dans le contrôle des phénotypes des VSMC (Lacolley et al., 2012) (Yoshida and Owens, 2005).



### c. La matrice extracellulaire vasculaire

#### *Les fibres élastiques et les protéines associées*

Les fibres élastiques sont des structures complexes contenant de l'**élastine** et des **microfibrilles**.

L'**élastine** est encodée par un seul gène et conduit à la production d'une protéine de 60-70kDa appelée **tropoélastine**. Cette protéine contient de nombreux résidus lysine qui seront engagés dans sa polymérisation par des enzymes nommées Lysyl-oxydases. Dans l'espace extracellulaire, plus de 80% des résidus lysine sont engagés dans des liaisons covalentes. L'élastine est produite en quantité importante au cours de la période périnatale et très peu au cours de la vie adulte. La synthèse de l'élastine s'initie au niveau de l'OFT au cours de la vie fœtale puis se répand progressivement de manière distale dans tout l'arbre artériel. Dans les plus grosses artères, cette expression commence dans la partie externe de la média puis se répand en direction du lumen (Wagenseil and Mecham, 2009).

La structure de base des **microfibrilles** est la **fibrilline**. C'est une glycoprotéine de 350kDa qui, à l'instar de la tropoélastine, est produite majoritairement au cours de la période périnatale. Chez l'homme, les mutations du gène de la fibrillin1 conduisent au syndrome de Marfan qui est caractérisé par des anomalies cardiaques, vasculaires, squelettiques et oculaires.

Les fibrillines ne sont pas que des simples molécules de structuration de l'espace extracellulaire, elles participent également à des voies de signalisation, par exemple en modulant l'activité des ligands de la famille TGF $\beta$ . De nombreuses molécules sont associées aux microfibrilles, comme les Emilines, les MAGP1-2 (microfibrilles associated glycoprotéines), les membres de la famille des fibulines, ...

L'Emiline-1 (elastin microfibril interface located protein) est retrouvée dans les tissus riches en élastine comme les artères ou la peau. Des études situent l'Emiline-1 à l'interface entre les microfibrilles et le core d'Elastine. L'Emiline-1 inhibe la signalisation TGF $\beta$  en se liant au pro-TGF $\beta$  et en inhibant son activation par des furines convertases (Kielty et al., 2002).

#### *Les collagènes*

17 types de collagène sont exprimés dans l'aorte de souris, mais les plus abondants sont les collagènes de type I, III, IV, V, VI. Les collagènes I, III et V forment des fibrilles de collagène. Le collagène IV forme également des fibres, mais il est davantage impliqué dans la liaison des différentes structures entre elles (McLean SE, 2005).

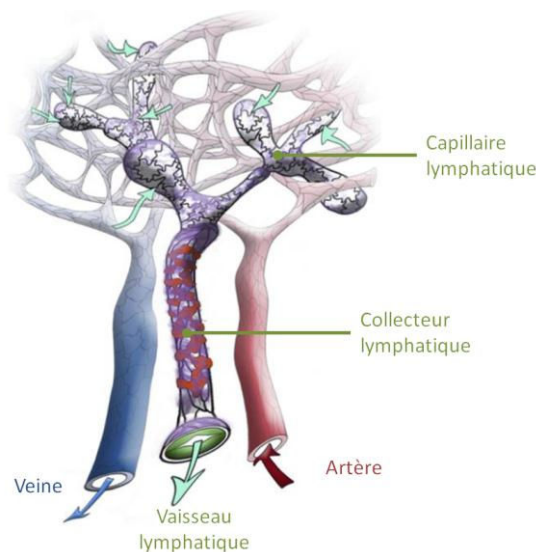
#### *Les protéoglycanes*

Les protéoglycanes sont des composants importants de la paroi des vaisseaux. Ils peuvent être classés en fonction du type de GAG (glycosaminoglycan) lié de manière covalente sur leur cœur protéique. On retrouve deux grands types de protéoglycanes : les gros protéoglycanes qui forment un réseau interconnecté de polymères dans l'espace extracellulaire et qui interagissent avec l'acide hyaluronique, et les petits protéoglycanes riches en leucine.

L'acide hyaluronique (HA) est un polymère linéaire composé d'une séquence répétée de disaccharides. Il est synthétisé par la HAS (hyaluronan synthase), une enzyme dont il existe 3 isoformes : HAS1 HAS2 et HAS3. Le HA interagit avec des récepteurs membranaires dont CD44 et RHAMM, présents de manière ubiquitaire, et avec LYVE-1, exprimé spécifiquement dans le système lymphatique. Le versican et l'aggrecan sont les deux gros protéoglycanes majeurs qui interagissent avec le HA. La famille des petits protéoglycanes riches en leucine comprend la decorine, le biglycan, la fibromoduline, l'osteoglycine, et le lumican (Wagenseil and Mecham, 2009).

## V. Lymphangiogenèse

Le processus de lymphangiogenèse sera détaillé dans la prochaine partie de cette introduction. Cependant, il mérite d'être introduit maintenant afin de permettre une vision d'ensemble du développement vasculaire. Le système lymphatique est un réseau composé de capillaires et de collecteurs, permettant d'absorber l'excès de liquides et de macromolécules présents dans le milieu extracellulaire (Figure 20). Ce réseau est qualifié de « borgne » car il ne débouche que d'un seul côté et ne constitue par un circuit fermé, au contraire du réseau sanguin. Le fluide collecté, la lymphe, est ramené dans le réseau sanguin au niveau des veines sous-clavières.



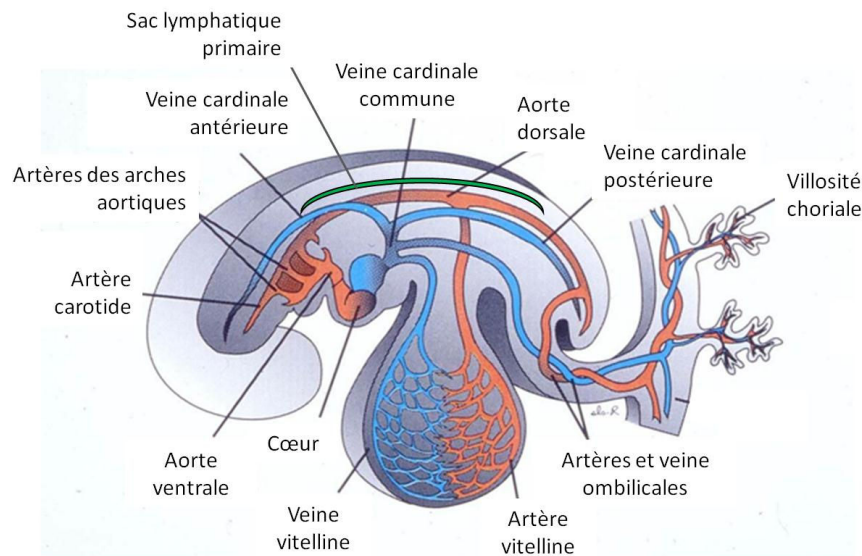
**Figure 20 Les réseaux vasculaires lymphatiques et sanguins.**

Le réseau lymphatique est composé de capillaires qui collectent la lymphe dans des vaisseaux plus larges nommés collecteurs. Les flèches rouges et bleues représentent le sens de circulation du sang, les flèches vertes, celui de la lymphe. D'après (Schulte-Merker et al., 2011)

Le réseau lymphatique est également impliqué dans l'absorption des lipides et des vitamines à partir de l'intestin et dans la réponse immunitaire. Les dysfonctions du système lymphatique sont à l'origine de gonflement des tissus appelés lymphœdèmes et de défauts de la fonction immunitaire. A ce stade de l'introduction, il est important de noter que le réseau lymphatique se développe à partir du réseau sanguin, dès la mi-gestation (E9.5) chez la souris et au cours de la 5<sup>ème</sup> semaine de développement chez l'humain. Il trouve son origine au niveau des veines cardinales.



Cette première partie d'introduction a abordé les processus développementaux permettant d'établir une vascularisation fonctionnelle au sein de l'embryon : le placenta, le cœur et les artères des arches aortiques, les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces composantes trouvent leur place dans un schéma général de la vascularisation de l'embryon (Figure 21).



**Figure 21 Schéma général du réseau vasculaire de l'embryon.**

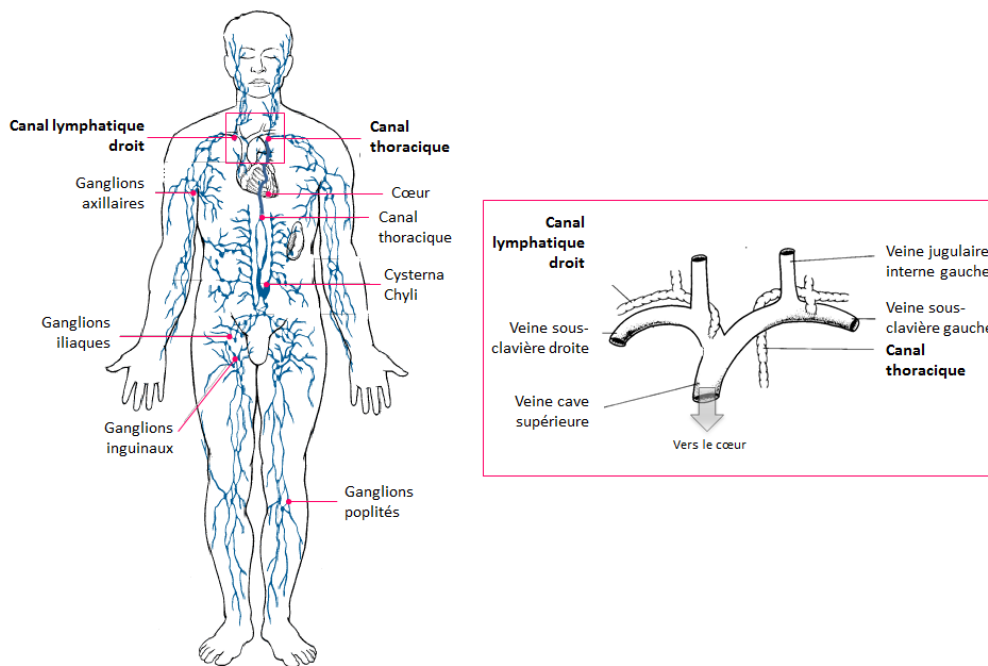
Le schéma correspond à une coupe sagittale d'un embryon de souris à mi-gestation (E10)

Schéma adapté de <http://www.78steps.com/scanning-electron/venous-system.html>

## Partie 2

# LE RESEAU LYMPHATIQUE

Le système lymphatique est un réseau vasculaire borgne essentiel à l'équilibre des fluides et à la réponse immunitaire (Figure 22). Chaque jour, chez un adulte sain, le système lymphatique permet de drainer et de ramener dans le circuit veineux 1 à 2 litres de liquide interstitiel chargé de 20 à 30 grammes de protéines (Foldi, 2004). Ce réseau est jalonné de ganglions lymphatiques, dans lesquels les antigènes sont présentés aux lymphocytes B et T pour activer la réponse immunitaire.



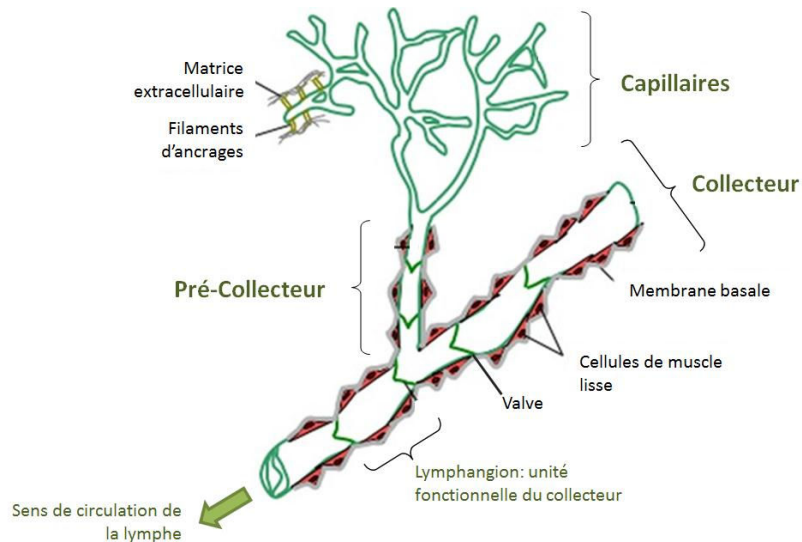
**Figure 22 Le système lymphatique et son raccordement au réseau veineux.**

Le système lymphatique permet de drainer et de ramener les fluides interstitiels dans le réseau veineux, au niveau des veines sous-clavières. Le canal lymphatique droit collecte les fluides en provenance de la partie haute et droite du corps dans la veine sous-clavière droite. Le canal thoracique collecte les fluides provenant du reste du corps dans la veine sous-clavière gauche. Schémas adaptés de:

[http://www.arthursclipart.org/medical/lymphatic/page\\_01.htm](http://www.arthursclipart.org/medical/lymphatic/page_01.htm) <http://www.docslide.com/lymphatic-system-2>

### I. Structure du réseau lymphatique

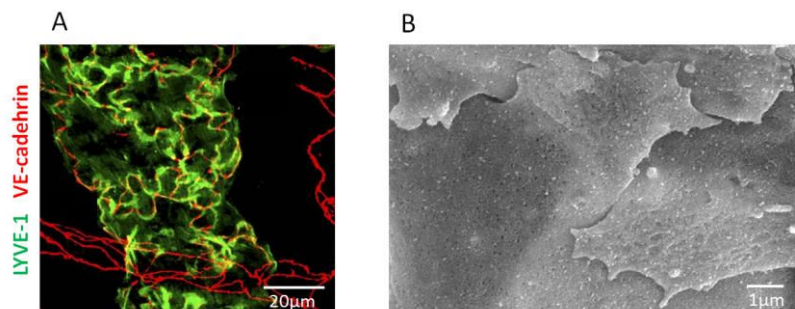
Le réseau lymphatique est composé de 3 types de vaisseaux : les capillaires, les pré-collecteurs et les collecteurs (Figure 23). Ils se distinguent par leurs caractéristiques morphologiques et moléculaires.



**Figure 23 Organisation du système lymphatique.**

Le réseau lymphatique est composé de 3 types de vaisseaux. Les capillaires permettent l'entrée des liquides interstitiels dans le réseau. Les collecteurs drainent la lymphe grâce à leur recouvrement par des cellules de muscle lisse et la présence de valves anti-reflux dans leur lumière. Les pré-collecteurs font le lien entre capillaires et collecteurs et partagent des caractéristiques avec ces deux types de vaisseaux. Schéma adapté de (Maby-El Hajjami and Petrova, 2008).

**Les capillaires lymphatiques** sont des vaisseaux borgnes composés de cellules endothéliales lymphatiques (LEC) ayant l'apparence de feuilles de chêne. Elles sont reliées entre elles par des jonctions discontinues appelées jonctions en boutons (« button like junctions ») (Figure 24) (Baluk et al., 2007). Ces jonctions positionnées à intervalles réguliers permettent aux LEC de se chevaucher légèrement et de former ainsi des clapets qui constituent le point d'entrée des liquides interstitiels dans le capillaire lymphatique. Les capillaires ne sont pas recouverts par des cellules de muscle lisse (SMC) et ne possèdent pas ou peu de membrane basale. Les LEC sont également reliées à la matrice extracellulaire (MEC) environnante par des filaments d'ancrage, ce qui évite au capillaire de s'effondrer sur lui-même sous la pression interstitielle (Figure 23) (Schulte-Merker et al., 2011).



**Figure 24 Structure des capillaires lymphatiques.**

A) Le marquage LYVE-1 en vert des capillaires permet de mettre en évidence des structures en feuille de chêne caractéristiques des capillaires lymphatiques. En rouge, le marquage VE-cadherine punctiforme souligne les jonctions en bouton.

B) La microscopie électronique à balayage de la surface externe d'un capillaire révèle la présence de clapets chevauchants, lieu d'entrée des liquides interstitiels dans le réseau lymphatique. D'après (Baluk et al., 2007).

**Les pré-collecteurs** recueillent ensuite la lymphe en provenance des capillaires. Ce second type de vaisseau partage des caractéristiques des capillaires et des collecteurs. Ils contiennent quelques valves, et sont parfois recouverts par des SMC (Lutter et al., 2012).

**Les collecteurs** constituent le 3<sup>ème</sup> type de vaisseaux lymphatique. Les LEC qui tapissent l'intérieur de ces vaisseaux sont reliées entre elles par des jonctions serrées continues (« zipper junctions ») et elles sont recouvertes de cellules de muscle lisse. La présence d'une membrane basale et de valves sont des caractéristiques importantes de collecteurs. Les valves vont assurer le caractère unidirectionnel du flux de lymphé dans les collecteurs, jusqu'à son arrivée dans le système sanguin au niveau des veines sous-clavières. Les collecteurs sont organisés en unités fonctionnelles, les « lymphangions », qui sont situés entre chaque série de valves (Figure 23) (Schulte-Merker et al., 2011).

## Caractéristiques moléculaires du réseau lymphatique mature.

### Marqueurs de l'ensemble du réseau lymphatique

De nombreux marqueurs peuvent être utilisés pour distinguer le réseau lymphatique (Baluk and McDonald, 2008). PROX1, la Podoplanine et le VEGFR-3 sont les plus largement exprimés et les plus utilisés.

**PROX1** (Prospero homeobox protein 1) est un facteur de transcription exprimé dans le réseau lymphatique. En plus de ses rôles dans le développement lymphatique, PROX1 régule la différenciation de cellules souches (Hope and Sauvageau, 2011) et est impliqué dans le développement du système nerveux central, du foie, du cœur (Oliver et al., 1993).

La **Podoplanine**, est un marqueur important de l'endothélium lymphatique. C'est une glycoprotéine transmembranaire qui est également exprimée par d'autres types cellulaires, tels les ostéocytes, les cellules épithéliales du thymus, les cellules de la granulosa... et notamment par les podocytes des glomérules rénaux, d'où elle tire son nom. De cellules tumorales de cancers variés expriment aussi la Podoplanine. Elle est cependant absente de l'endothélium sanguin (Raica et al., 2008).

**VEGFR-3**, le récepteur du VEGF-C et du VEGF-D est largement exprimé dans le réseau lymphatique. Il est cependant aussi exprimé par les capillaires fenêtrés du réseau sanguin (Kamba et al., 2006) et par certaines cellules souches (Salven et al., 2003).

### Les capillaires

Les capillaires lymphatiques expriment des niveaux élevés du récepteur **LYVE-1** (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1). C'est le seul compartiment lymphatique mature exprimant cette protéine. LYVE-1 interagit avec une protéine de la MEC, l'acide hyaluronique, sans que son rôle précis soit connu. Les capillaires, qui sont les sites principaux de lymphangiogenèse, expriment des forts taux de VEGFR-3 (Wirzenius et al., 2007). LYVE-1 est aussi exprimé dans certaines parties du réseau sanguin comme les sinusoides du foie (Mouta Carreira et al., 2001) et les capillaires pulmonaires (Favre et al., 2003).

### Les lymphangions

Les LEC des lymphangions sont recouvertes de cellules de muscle lisse (SMC) dont les fibres de  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin / ACTA2) sont organisées de manière hélicoïdale (Margaris and Black, 2012). Les LEC du lymphangion sont de forme squameuse et leur actine est corticale, au contraire de celle des valves qui est périnucléaire (Sabine et al., 2012).

## Les valves

Les valves matures sont classiquement composées de 2 feuillets qui se projettent à l'intérieur de la lumière du vaisseau (Figure 25). Ces feuillets sont composés de 2 couches de LEC séparés par un cœur de matrice. Les LEC des valves matures expriment des niveaux élevés de 4 facteurs de transcription : **PROX1**, **FOXC2** (Forkhead box protein C2), **NFATC1** (nuclear factor of activated T cells) (Norrmén et al., 2009) et **GATA2** (Kazenwadel et al., 2012). Foxc2 est impliqué dans le développement des artères des arches aortiques, dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse (Kume, 2008). NFATc1 est impliqué dans la régulation des cellules immunitaires et dans l'ostéogenèse (Norrmén 2009). GATA2 est un facteur de transcription jouant un rôle crucial dans l'hématopoïèse et dans le développement urogénital et neuronal (Kazenwadel et al., 2012).

Des protéines transmembranaires sont aussi exprimées à des niveaux élevés dans les valves matures. C'est le cas de la **VE-cadhérine** (Vascular Endothelial Cadherin / CD 144) qui est une glycoprotéine exprimée à la surface des EC et impliquée dans les jonctions inter-endothéliales et dans la perméabilité endothéliale. Les **Cx37**, **Cx43** et **Cx47** (Cx : Connexin) sont des protéines qui s'assemblent en groupe de 6 unités pour former des jonctions intercellulaires directes, les « gap junctions » ou jonctions communicantes.

La **SEMA3A** (semaphorine 3A) est une protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire qui est impliquée dans la guidance axonale. Elle exerce ses effets en se liant sur les récepteurs **Plexine-A1** et **NRP1** (Neuropiline 1).

Enfin, les protéines de la MEC Laminine-α5 et FN-EIIIA (Fibronectine-EIIIA/EDA) sont surexprimées dans le cœur de matrice de la valve. La FN-EIIIA est un variant d'épissage de la fibronectine qui interagit avec le récepteur transmembranaire ITGA9 (Intégrine-α9). Les intégrines sont des protéines hétéro-dimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β.

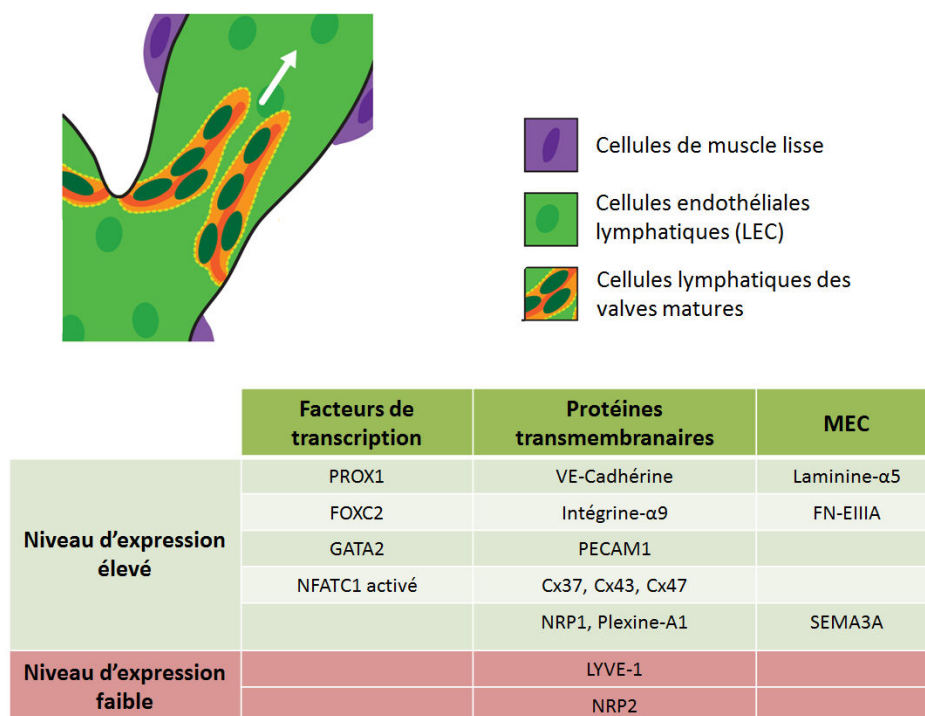
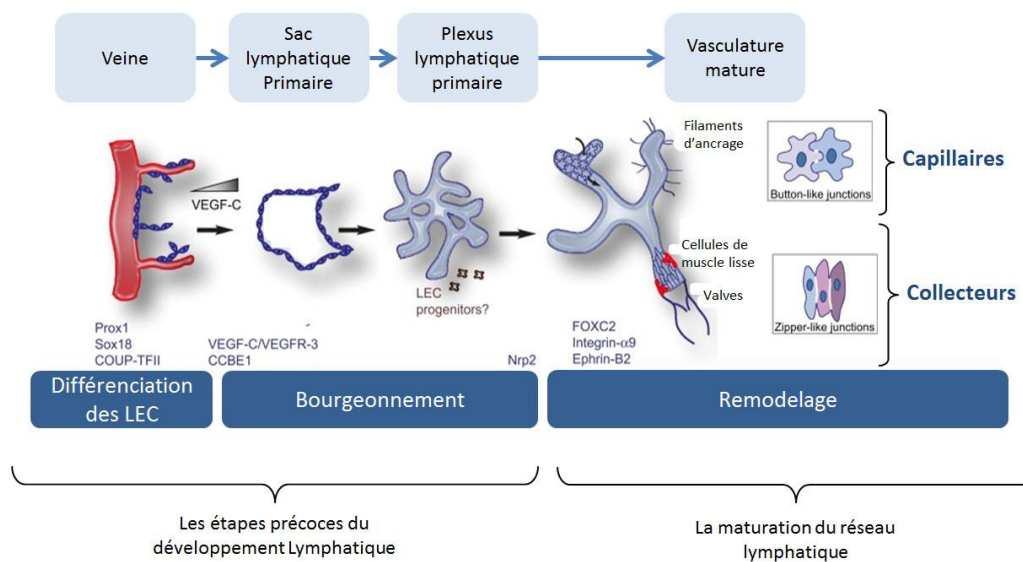


Figure 25 Caractéristiques moléculaires des valves matures.

Schéma adapté de (Koltowska et al., 2013).

## II. Développement du réseau lymphatique

Le réseau lymphatique commence à se former à E9.5/E10 chez la souris avec la différenciation des LEC (à partir des CE veineuses) et leur bourgeonnement pour conduire à la formation d'un plexus lymphatique primaire (Figure 26). Ce sont les étapes précoces du développement lymphatique, qui seront traitées dans un premier temps. Dans un second temps, la maturation du réseau lymphatique sera abordée. Elle conduit à la formation de capillaires et de collecteurs matures, une maturation qui s'effectue plus ou moins rapidement suivant les territoires vasculaires considérés.



**Figure 26 Les étapes du développement lymphatique.**

La formation d'un réseau lymphatique mature s'effectue en 3 grandes étapes: Différenciation des LEC, Bourgeonnement et Remodelage. D'après: (Martinez-Corral and Makinen, 2013).

### 1. Les étapes précoces du développement lymphatique, de E9.5 à E15

Les étapes précoces du développement lymphatique consistent en la formation de sacs lymphatiques à partir du réseau sanguin veineux. Ces sacs se réorganisent ensuite en un plexus lymphatique primaire.

#### a. Description

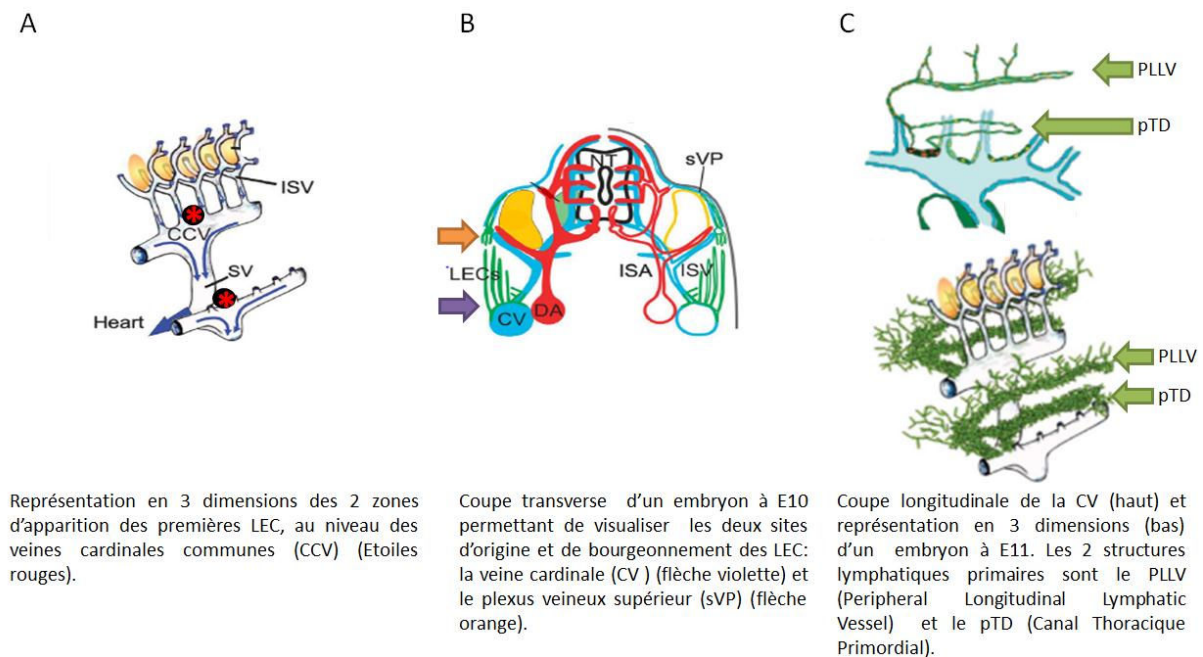
Les étapes précoces du développement lymphatique ont été récemment affinées par l'équipe du Dr. Kiefer grâce à l'utilisation de l'ultramicroscopie et des coupes optiques qu'elle permet de réaliser. Les structures de l'embryon sont de ce fait intégralement conservées. Comme admis jusque-là, cette équipe confirme que **la différenciation des CE veineuses en LEC** se déroule principalement au niveau de la veine cardinale (CV) (Figure 27, A), mais elle montre pour la première fois qu'elle a également lieu de manière plus périphérique, au niveau du plexus veineux superficiel (sVP) (Figure 27, B) (Hagerling et al., 2013). La différenciation débute à E9.5.

Ces **LEC primordiales vont bourgeonner et migrer** sous forme de filaments et se regrouper ensuite dans la région jugulaire en 2 structures vasculaires primaires distinctes, auparavant appelées de manière générique « sacs lymphatiques ». La première de ces régions est située dorsalement et se nomme « peripheral longitudinal lymphatic vessel » (PLLV), l'autre est ventrale et constitue le « canal



thoracique primordial » (pTD) (Figure 27, C). Les auteurs montrent que le bourgeonnement s'initie au niveau de la veine cardinale commune et se répand ensuite symétriquement de manière craniale et caudale. Dès E11, les régions du PLLV et du pTD présentent un lumen et sont rattachées à la CV. Le réseau primaire immature continue ensuite à s'étendre par bourgeonnement. (Hagerling, Kiefer, EMBO J 2013).

Les plaquettes interviennent lors de la **séparation des réseaux lymphatiques et sanguins**, elles permettent de sceller le pTD en même temps que se développent les valves lymphoveineuses qui éviteront ensuite le mélange du sang et de la lymphe.



**Figure 27 Les étapes précoces du développement lymphatique.**

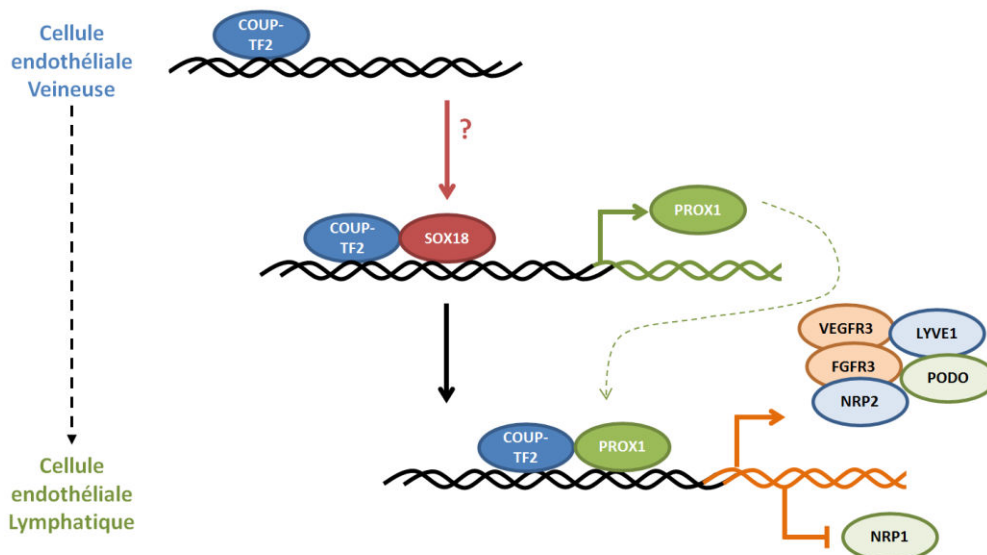
Visualisation de la zone d'apparition des 1<sup>ères</sup> LEC (A), et de leurs 2 origines (B), qui après bourgeonnement et migration vont former le canal thoracique primordial (pTD) et le Peripheral Longitudinal Lymphatic Vessel (PLLVD) (C). CV: Veine Cardinale, DA: Aorte Dorsale, sVP: Plexus Veineux supérieur, ISA / ISV: Artère / Veine Inter Segmentaire, CCV: Veine Cardinale Commune, SV: Sinus Veineux, NT: Tube Neural. D'après: (Hagerling et al., 2013).

## b. Mécanismes moléculaires

A ce jour, l'implication de 3 facteurs de transcription est décrite dans **la différenciation des EC veineuses en LEC** : SOX18, COUPTFII et PROX1 (Figure 28). Le facteur de transcription SOX18 est exprimé plus précocement que PROX1 dont il contrôle l'expression en se liant sur son promoteur (Francois et al., 2008). Cependant, le signal déclenchant l'induction de PROX1 par SOX18 dans des zones particulières de la veine cardinale n'est pas connu. PROX1 possède un rôle majeur dans la plasticité des cellules endothéliales. Sa surexpression dans les CE sanguines induit l'expression de marqueurs lymphatiques et inhibe celle de marqueurs sanguins (Petrova et al., 2002).

COUP-TFII est un facteur de transcription impliqué dans la maintenance du phénotype veineux des CE par induction du récepteur EphB4 et l'inhibition de la voie NOTCH (You et al., 2005). COUP TFII interagit avec PROX1 et est impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes responsables de la spécification du lignage lymphatique tels VEGFR-3, FGFR-3 et NRP2, le corécepteur de VEGF-C (Lin et al., 2010) (Lee et al., 2009). Par ailleurs, l'expression de PROX1

nécessite également la liaison de COUP-TFII dans son promoteur. COUP-TFII est donc impliqué dans l'induction et dans le fonctionnement de PROX1 (Yamazaki et al., 2009) (Srinivasan et al., 2010). PROX1 interagit également avec le facteur de transcription ETS2, ce qui permet l'induction de gènes régulateurs du bourgeonnement des LEC, comme VEGFR-3. D'autres membres de la famille ETS semblent également interagir avec PROX1 (Yoshimatsu et al., 2011). Chez les souris invalidées pour *Sox18*, *Prox1* ou *CoupTfII*, les LEC n'arrivent pas à se former à partir des BEC (blood endothelial cell) de la veine cardinale (Francois et al., 2008) (Lin et al., 2010) (Wigle and Oliver, 1999).



**Figure 28 Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des EC veineuses en EC lymphatiques: COUP-TF2, SOX18 et PROX1.**

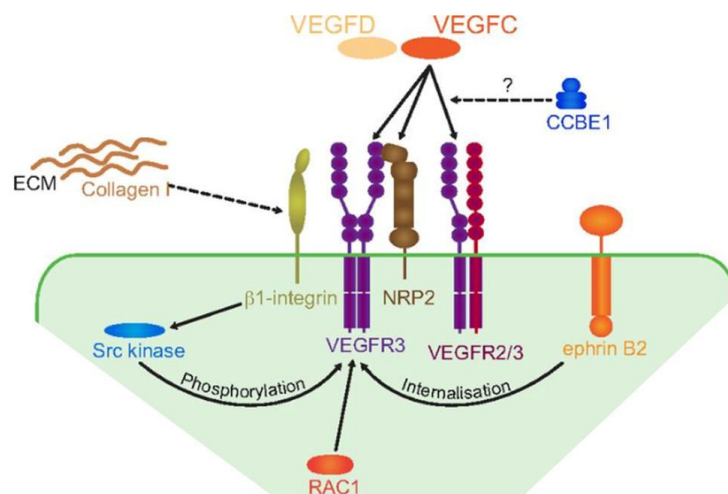
SOX18 et COUP-TF2 contrôlent l'expression de PROX1. Ensuite, PROX1 et COUP-TF2 sont impliqués dans la transcription de gènes du lignage lymphatique. (En orange, les gènes régulés par PROX1 et COUP-TF2, en bleu, les régulations par COUP-TF2 et en vert les régulations par PROX1). D'après: (Lee et al., 2009) (Lin et al., 2010) (Srinivasan et al., 2010).

**Le bourgeonnement, la migration et la prolifération de ces nouvelles LEC** se fait largement en réponse à l'activation de la **voie de signalisation VEGFR-3/NRP2 par le VEGF-C**, produit par le mésoderme, avec la présence nécessaire du corécepteur NRP2 (Figure 29) (Xu et al., 2010) (Yuan et al., 2002). Le VEGF-C se lie sur son récepteur VEGFR-3/FLT4, exprimé à des niveaux élevés dès les stades précoces du développement lymphatique par les cellules PROX1-positives (Tammela et al., 2008). Le corécepteur majeur du VEGF-C est la neuropiline-2, initialement décrit comme un récepteur des sémaphorines et un médiateur de la guidance axonale. Sa présence est indispensable pour que le bourgeonnement des LEC soit suffisant (Xu et al., 2010). Des protéines modulatrices de la signalisation VEGF-C sont aussi impliquées dans les étapes précoces du développement lymphatique. Il est possible de citer l'intégrine- $\beta$ 1, la kinase Src, l'EphrinB2 et RAC-1 (Figure 29) (Koltowska et al., 2013).

Une seconde voie de signalisation, moins bien documentée, mais néanmoins indispensable dans le développement lymphatique, est celle de **CCBE1** (Collagen- and calcium-binding EGF domains 1). CCBE1 est une protéine sécrétée par différents tissus au cours du développement embryonnaire tels le cerveau, le mésothélium cardiaque, ainsi que par des cellules du mésoderme proches de la veine cardinale et des sacs lymphatiques. Elle se lie à différents composants de la MEC et ne semble



pas avoir d'activité lymphangiogénique propre. Par contre elle augmente de façon très importante les effets du VEGF-C in vivo (Figure 29) (Bos et al., 2011).



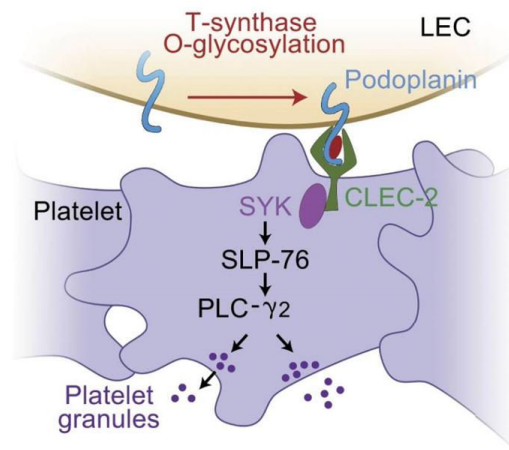
**Figure 29 Modulation de la signalisation VEGF-C / VEGFR3 dans les étapes précoces du développement lymphatique.**

Le récepteur à tyrosine kinase VEGFR3 et son corécepteur la neuropiline-2 (NRP2) ont un rôle central dans la signalisation VEGF-C. L'Ephrin-B2 contrôle l'internalisation des complexes de récepteurs. La phosphorylation du VEGFR3 est modulée par l'intégrine-β1 via la régulation de l'activité de la kinase SRC. Les protéines de la MEC sont potentiellement impliquées dans l'activation de l'intégrine-β1. La petite protéine G RAC1 régule les niveaux de VEGFR-3. La protéine extracellulaire CCBE1 augmente les effets du VEGF-C. Schéma adapté de (Koltowska et al., 2013).

L'importance de VEGFR-3 et de CCBE1 dans le développement lymphatique est soulignée par leur implication dans 2 pathologies humaines associées à des lymphœdèmes : le syndrome de Hennekam (CCBE1) (Alders et al., 2009) et la maladie de Milroy (VEGFR3) décrite dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et dont la cause génétique a été découverte en 2000 (Irrthum et al., 2000).

La voie de signalisation de l'**adrénoméduline (AM)** est également impliquée dans ces étapes précoces. L'AM est un peptide vasodilatateur qui est impliqué dans l'angiogenèse, la prolifération et la migration des EC. La perte de la signalisation par l'AM est responsable de la formation de sacs lymphatiques hypomorphiques, ce qui peut être relié à une moindre prolifération des LEC au niveau de ces structures (Fritz-Six et al., 2008).

Le rattachement des sacs lymphatiques à la veine cardinale nécessite la mise en place d'une **séparation entre les compartiments lymphatique et veineux**. Cela est réalisé par le développement de valves lympho-veineuses. Ce territoire valvulaire se distingue dès E11.25 par un cluster de cellules surexprimant Prox1 (Hagerling et al., 2013) et par la présence d'un thrombus plaquettaire. La formation de ce thrombus nécessite l'interaction de podoplanine, une protéine transmembranaire exprimée par les LEC, et de CLEC2, son récepteur exprimé par les plaquettes (Figure 30). Cela conduit à l'activation plaquettaire de la voie de signalisation SYK / SLP76. La liaison de la podoplanine sur le récepteur CLEC2, une lectine de type C, active SYK, une kinase largement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, qui va phosphoryler SLP76 et *in fine* conduire à l'agrégation plaquettaire (Bertozi et al., 2010). La surexpression de PROX1 au niveau des valves lymphoveineuses est également retrouvée dans les valves lymphatiques.



**Figure 30 La séparation des vasculatures sanguine et lymphatique.**

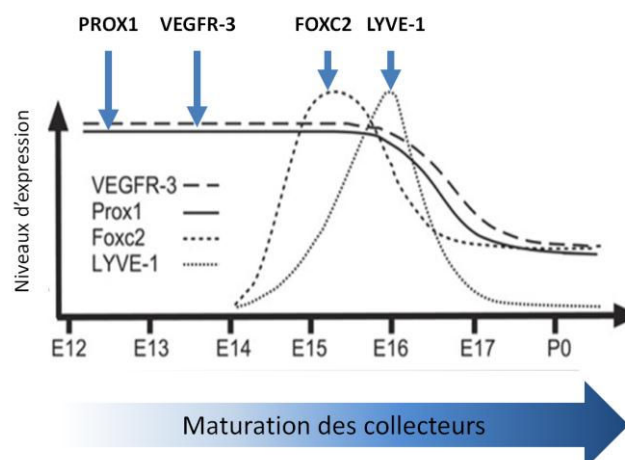
La glycosylation de la podoplanine est une étape importante de sa maturation. L'interaction de la podoplanine avec son récepteur plaquettaire CLEC-2 entraîne l'activation de la kinase SYK (spleen tyrosine kinase). La phosphorylation de SLP76 (SRC homology 2 (SH2)-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) permet *in fine* l'agrégation plaquettaire via la PLC- $\gamma$ 2 (Phospholipase C -  $\gamma$ 2). D'après Schulte-merker petrova, 2011.

## 2. La maturation du réseau lymphatique, à partir de E15

La maturation du réseau lymphatique consiste en l'acquisition d'un phénotype « collecteur » ou « capillaire » par les vaisseaux du plexus lymphatique primitif. Le phénotype collecteur requiert en particulier la formation des valves, le recouvrement des lymphangions par les SMC et la formation d'une membrane basale.

### a. L'initiation du phénotype collecteur

L'initiation du phénotype collecteur met en jeu des variations importantes des marqueurs lymphatiques (Figure 31). De manière abrupte, à partir de E14.5 les LEC se mettent à exprimer des niveaux élevés de FOXC2, puis à partir de E15.5 l'expression de LYVE1 augmente. Ces taux vont ensuite décroître à partir de E16.5, de même que ceux de VEGFR-3 et de PROX1 (Norrmen et al., 2009). La signification de ces variations, et notamment la diminution de LYVE1, est actuellement inconnue.



**Figure 31 Variation des niveaux d'expression des marqueurs lymphatiques au cours de la maturation des collecteurs.**

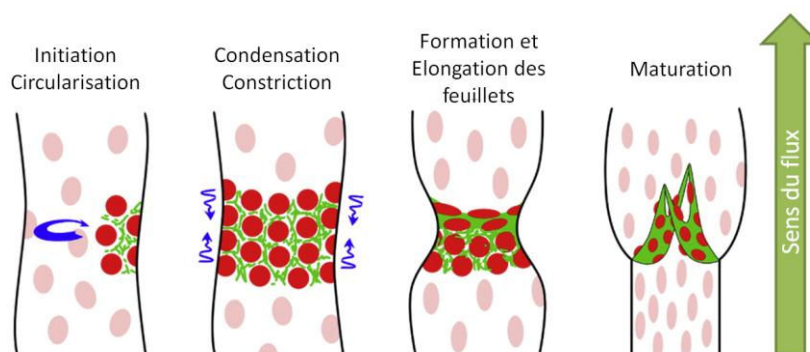
Schéma adapté de (Norrmen et al., 2009).

La diminution de l'expression de LYVE-1 est au moins pour partie liée au **flux**, qu'il soit oscillatoire ou laminaire (Sabine et al., 2012). Elle est également liée à **ANG2** puisque les souris *Ang2*<sup>-/-</sup> conservent des niveaux anormalement élevés de LYVE-1 dans leurs collecteurs (Dellinger et al., 2008). De la même manière, les embryons *Foxc2*<sup>-/-</sup> conservent des niveaux anormalement hauts de PROX1, LYVE1 et VEGFR-3. Le facteur de transcription **FOXC2** participe donc aux étapes initiales de l'acquisition du phénotype collecteur (Norrmen et al., 2009). Cependant, pour ces deux études, il n'est pas possible de savoir si ANG2 et FOXC2 régulent LYVE1, PROX1 et VEGFR-3 ou si le maintien de ces marqueurs est simplement une conséquence du défaut de maturation.

## b. La morphogenèse des valves

La formation des valves lymphatiques (et veineuses) se fait par invagination de l'endothélium dans le lumen, et non par la formation d'un coussin mésenchymateux (comme c'est le cas pour les valves cardiaques). Dans le mésentère de souris, l'initiation de la formation des valves est corrélée avec le début de la circulation de la lymphe, à E15 (Sabine et al., 2012), et elle précède le recrutement des VSMC (Norrmen et al., 2009) (Bazigou et al., 2009). La formation d'une valve lymphatique requiert l'enchaînement de plusieurs étapes. Une description brève de ces étapes permettra d'avoir une vue d'ensemble du processus. Les mécanismes moléculaires de la formation des valves seront ensuite détaillés.

La formation des valves débute par l'apparition, sur le côté d'un collecteur, d'un groupement de LEC exprimant des niveaux élevés des facteurs de transcription PROX1 et FOXC2. Un processus de circularisation permet ensuite de spécifier le territoire de la valve. Cette zone circulaire subit ensuite une constriction qui correspond à l'initiation de la formation des feuillets. L'élongation de ces feuillets constitue la dernière étape du processus qui conduit à la formation d'une valve mature (Figure 32).



**Figure 32 Les étapes de la formation d'une valve lymphatique.**

Les LEC exprimant des niveaux élevés de PROX1 sont représentées en rouge, et les dépôts de laminine- $\alpha$ 5, une protéine de la matrice extracellulaire des valves, en vert. D'après (Sabine et al., 2012).

### Les étapes précoces de formation d'une valve :

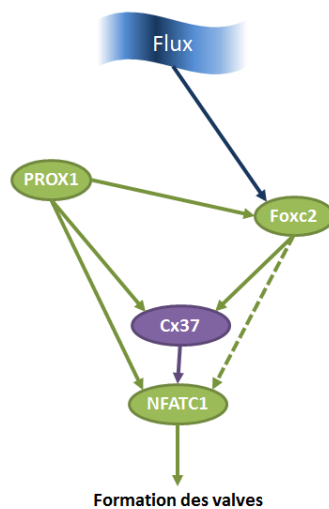
Le premier signe de l'apparition d'une valve est la formation d'un groupe de cellules sur-exprimant les facteurs de transcription PROX1 et FOXC2. Cependant, le processus à l'origine de la formation d'une valve n'est pas complètement élucidé.

Le regroupement initial de cellules s'étend ensuite de manière circulaire. Les cellules se réorientent perpendiculairement à l'axe du vaisseau, forment une constriction et la production de Laminine- $\alpha$ 5 débute. Les cellules de la partie amont de la valve expriment des niveaux plus élevés de

PROX1 que de FOXC2, et vice versa pour la partie avale. Cette polarisation semble indiquer que le sens d'élongation des feuillets est déterminé de manière précoce (Sabine et al., 2012).

Les valves sont fréquemment situées à des embranchements, lieux où le flux et les forces de cisaillement (sheer stress) sont particuliers, laissant supposer que les stimuli mécaniques pourraient être impliqués dans la localisation de la valve. Dans ce contexte, il a été démontré qu'un **flux oscillatoire** induisait **Cx37** et activait la voie de signalisation **Calcineurine/NFATC1**, de manière PROX1 et FOXC2 dépendante (Sabine et al., 2012). La Calcineurine est une phosphatase activée en présence de calcium et déclenchant la translocation nucléaire de Nfatc1.

La Cx37 permet ensuite la formation de la zone circulaire délimitant le territoire de la valve. L'invalidation de Cx37 empêche la formation de valves et conduit à de graves défauts de drainage (Sabine et al., 2012). PROX1 régule également l'expression de NFATC1 et NFATC1 et FOXC2 interagissent in vitro pour le contrôle de la transcription de gènes (Norrmen et al., 2009).



**Figure 33 Les mécanismes précoces de la formation des valves.**  
Schéma adapté de (Norrmen et al., 2009) (Sabine et al., 2012).

La voie de signalisation réverse d'**EphrinB2** est importante dans le développement des valves, sans que le mécanisme moléculaire précis n'ait été élucidé. Le ligand transmembranaire EphrinB2 exprimé par une cellule déclenche canoniquement une cascade de signalisation dans une autre cellule exprimant son récepteur EphB4. C'est la signalisation « vers l'avant ». Mais une signalisation « réverse », c'est-à-dire dans la cellule qui exprime EphrinB2, peut également avoir lieu. Elle passe, entre autre, par le recrutement de protéines intracellulaires possédant un domaine PDZ. Les souris dont l'EphrinB2 porte une mutation dans son site de liaison aux domaines PDZ ne développent pas de valves (Makinen et al., 2005).

La signalisation par le récepteur **TIE2** semble aussi être impliquée dans la formation des valves. En effet, les souris invalidées pour **ANG2**, un ligand de TIE2, présentent notamment un faible nombre de valves associé à des défauts de maturation de leur système lymphatique (Dellinger et al., 2008). Le rôle de TIE2 est possiblement lié à son induction par les forces de cisaillement, bien que ces résultats aient été obtenus à partir de cellules endothéliales sanguines (HUVEC) (Lee and Koh, 2003). Cependant, le flux dans le réseau lymphatique est plus faible que celui du réseau sanguin.

La voie **PI3K/AKT** est recrutée dans les étapes initiales de formation des valves. La spécificité lymphatique de l'activation de PI3K semble être liée à ses sous-unités régulatrices p85alpha,

p55alpha, and p50alpha. En effet, la délétion du gène *Pik3r1* qui les encode est responsable d'anomalies lymphatiques chez la souris, dont un défaut de formation des valves (Mouta-Bellum et al., 2009). L'importance de la signalisation Akt dans le développement des valves est renforcée par l'absence de valves dans les petits collecteurs des souris *Akt1*<sup>-/-</sup> (Zhou et al., 2010). Au niveau mécanistique, il a été montré que PI3K entraîne la down-régulation de l'endogline (Mouta-Bellum et al., 2009). Cette régulation de l'endogline, avait déjà été observée chez les souris *Foxc2*<sup>-/-</sup> (Petrova et al., 2004), ce qui peut suggérer que la **signalisation TGFβ/BMP** est aussi impliquée dans la maturation du réseau lymphatique.

### **Les étapes tardives de formation des valves : la formation des feuillets**

Les feuillets se développent avec la formation de protrusions de LEC à l'intérieur du lumen et le début de l'élongation. D'autres composants de la MEC se déposent alors, notamment le collagène IV et la fibronectine EIIIA. En même temps que se forment les feuillets, la paroi du vaisseau se dilate, formant ainsi le sinus de la valve, cet espace de part et d'autre des feuillets. Au début de la formation des feuillets, la Laminine-α5 et la FNEIIIA co-localisent, tandis qu'au cours de l'élongation des feuillets la Laminine-α5 se dépose dans l'ensemble du cœur de matrice et la FNEIIIA se concentre sur les bords libres des feuillets (Bazigou et al., 2009).

La **voie de signalisation PCP** (Planar Cell Polarity) est impliquée dans la formation des feuillets de la valve. Cette voie de signalisation régule les mouvements cellulaires polarisés et la morphogenèse tissulaire dans de nombreux organes. La composante la plus importante de cette voie est une cadhérine nommée **CELSR1** chez les vertébrés. Cette protéine transmembranaire recrute à la membrane d'autres protéines dont **VANGL2** (Van Gogh Like). Les embryons dont des composants de la voie de signalisation PCP ont été mutés présentent des défauts de formation de leurs valves. L'initiation du processus et les dépôts de MEC (Laminine-α5 et FNEIIIA) ne sont pas affectés. Cependant, les cellules PROX1-positives n'arrivent pas à se réorienter perpendiculairement à l'axe du flux. En conséquence, les feuillets de la valve ne se forment pas (Tatin et al., 2013).

Les étapes tardives de formation des valves font appel à la signalisation **ITGA9/FNEIIIA**. Les souris *Itga9*<sup>-/-</sup> et *FNEIIIA*<sup>-/-</sup> présentent, à la place des valves matures, de simples constriction avec des embryons de feuillets dont le cœur de matrice est désorganisé ou absent. La FNEIIIA semble particulièrement impliquée dans l'élongation des feuillets au cours de la période périnatale et la communication ITGA9/FNEIIIA est nécessaire à la polymérisation de la FNEIIIA en fibres continues. L'Intégrine-α5, bien qu'incapable de compenser la perte de ITGA9, participerait aussi à la fibrillogenèse. En outre, le phénotype des *FNEIIIA*<sup>-/-</sup> étant moins marqué que celui des *Itga9*<sup>-/-</sup>, voir même compensable ultérieurement au cours du développement, la possibilité de l'implication d'autres ligands n'est pas exclue (Tenascine-C ou Osteopontine) (Bazigou et al., 2009).

La signalisation **SEMA3A/NRP1/PlexinA1** est impliquée dans les étapes tardives de formation des valves. Que ce soit le traitement anti-NRP1 (Jurisic et al., 2012) ou l'invalidation de *Sema3A* ou *Nrp1* ou *PlexinA1* chez la souris (Bouvree et al., 2012), aucune des 2 approches n'affecte le nombre total de valves, mais plutôt leur morphologie : mauvaise localisation et dépôt excessif d'Intégrine-α9 et de FNEIIIA (Jurisic et al., 2012) ; longueur du dépôt d'Intégrine-α9 plus courte (Bouvree et al., 2012). Le groupe du Dr. Eichmann suggère que l'effet répulsif entre ces composants pourrait pousser

les cellules de la valve à se projeter vers l'intérieur du lumen et ainsi participer à l'élongation de la valve.

La signalisation **VEGFC/D** est impliquée dans le développement des valves, bien qu'elle soit peu décrite. VEGFR-3 et FOXC2 coopèrent dans le développement des valves (Petrova et al., 2004), et les niveaux de VEGFR-3 sont élevés dans les feuillets des valves (Norrmen et al., 2009). Pour sa part VEGF-C induit la translocation nucléaire de NFATC1 par l'activation de VEGFR-2. VEGFR-3 est incapable d'induire seul cette translocation, mais un hétérodimère VEGFR-2/VEGFR-3 n'est pas exclu (Norrmen et al., 2009). L'expression de la NRP2, le corécepteur de VEGFR-3, est diminuée en réponse à un flux oscillatoire (Sabine et al., 2012) et NRP1 est impliqué dans l'élongation des feuillets. La signalisation VEGFC/D est donc à l'évidence importante dans le développement des valves mais l'implication de ses différents éléments reste à préciser.

### c. Le maintien de valves.

La voie de signalisation **Calcineurine/NFATC1** est maintenue active dans les valves adultes. Par contre, l'invalidation inductible postnatale de cette voie (en utilisant CNB1, la sous unité régulatrice de la calcineurine et la recombinaise exprimée de manière inductible sous le contrôle du promoteur de PROX1) conduit en 7 jours à une diminution significative du nombre de valves et de la longueur de leur cœur de matrice. Cette observation est également valable pour les valves adultes, après 3 semaines de traitement au Tamoxifen. L'activation continue de la voie Calcineurine/NFATC1 semble donc être nécessaire à la maintenance des valves (Sabine et al., 2012).

L'équipe du Dr. Makinen a étudié le rôle de **ITGA9** dans le maintien des valves en supprimant l'expression de cette intégrine entre P1 et P7. Dans ces conditions, le nombre de valves et leur apparence (évaluée par le marquage Laminine- $\alpha 5$  et la liaison des CE sur le cœur de matrice) ne sont pas affectés. Il serait intéressant d'étendre la durée du traitement pour vérifier l'état du cœur de matrice et l'ancrage des EC sur ce support (Bazigou et al., 2009). Cette même équipe a également invalidé des composants de la **voie de signalisation PCP** chez l'adulte pendant 2 semaines. Cette délétion n'affecte pas l'apparence des valves (Tatin et al., 2013).

### d. Le recouvrement des lymphangions par les cellules murales

Le recrutement des cellules de muscle lisse est une étape importante de la maturation du réseau lymphatique. Physiologiquement, ce recouvrement n'a lieu qu'au niveau des lymphangions. Le recouvrement ectopique des valves et des capillaires par des SMC est pathologique et entraîne des défauts de drainage (Petrova et al., 2004). Le début du recouvrement des lymphangions par les cellules murales varie en fonction des territoires lymphatiques : il commence à E17.5 dans le mésentère (Norrmen et al., 2009) et plus tardivement dans la peau de l'oreille, vers P15 (Lutter et al., 2012).

Les groupes des Dr. Detmar et Eichman ont étudié la signalisation **SEMA3A/NRP1** et ont montré que son activation empêche le recouvrement péricitaire anormal de la valve. Le groupe d'Anne Eichmann a également montré que la PlexinA1 était un autre récepteur également impliqué dans la signalisation SEMA3A/NRP1. Alors que SEMA3A semble exprimée dans l'ensemble du réseau lymphatique, PlexinA1 et NRP1 sont surexprimées au niveau des valves. Le groupe du Dr. Detmar conclut que SEMA3A, produite par les LEC est capable de repousser les SMC exprimant son récepteur, la NRP1 (Jurisic et al., 2012). Le groupe du Dr. Eichmann est moins tranché dans ses



conclusions puisqu'il trouve les 3 composants exprimés dans les LEC et dans les SMC (Bouvree et al., 2012).

La **Reeline** (RELN), une grosse glycoprotéine auparavant connue pour son rôle dans le développement neuronal, était impliquée dans le recouvrement des collecteurs par des VSM. Les souris *Reln*<sup>-/-</sup> présentent une couverture par les SMC moins importante dans les collecteurs de la peau de l'oreille. Cette observation n'est pas valable pour les collecteurs mésentériques, ce qui renforce l'idée de processus de maturation différents en fonction du territoire lymphatique. Les auteurs montrent que le contact des SMC avec les LEC entraîne la sécrétion de Reeline par les LEC. Par une action autocrine, la Reeline provoque la production de MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1), un facteur favorisant la migration et la prolifération des LEC (Lutter et al., 2012).

Les composants de la voie de signalisation **NOTCH** sont impliqués dans le développement lymphatique à plusieurs niveaux. La maturation des collecteurs est affectée chez des souris traitées avec des anticorps anti-DLL4 ou anti-NOTCH1 : le recouvrement des lymphangions par les SMC est éparé et les collecteurs sont dilatés (Niessen et al., 2011). La **signalisation AKT** est aussi impliquée dans le recrutement des SMC. En effet, les souris *Akt1*<sup>-/-</sup> ont un recouvrement très éparé de leurs lymphangions par les SMC (Zhou et al., 2010). La signalisation **ANG2** est peut-être également impliquée dans la maturation des lymphangions. Les souris *Ang2*<sup>-/-</sup> présentent une absence de valves dans leurs collecteurs dont les CE présentent en plus un aspect en feuille de chêne. ANG2 interviendrait donc pour limiter une trop forte expansion du phénotype capillaire à l'ensemble du réseau (Dellinger et al., 2008).

#### e. La formation de la membrane basale

Dans les vaisseaux sanguins, la MB (membrane basale) est composée principalement de Collagène IV, Laminine, Nidogen/Entactine et de protéoglycane et est bien documentée (Sasaki et al., 2004). En comparaison, peu de choses sont connues sur la composition et l'importance de la MEC dans le réseau lymphatique. La formation de la membrane basale autour des collecteurs débute dès E16.5 dans le mésentère, comme le montre un marquage du Collagène IV (Norrmen et al., 2009). Dans la peau de l'oreille, les marquages apparaissent plus tardivement, vers P12. Jusqu'à P16, la Laminine- $\alpha 5$  est cantonnée aux zones des valves, mais à partir de ce moment, elle est exprimée plus largement dans le lymphangion, à des niveaux qui restent néanmoins plus faibles que dans les valves (Lutter et al., 2012).

En plus de son implication dans le recrutement des SMC, la **Reeline** semble aussi jouer un rôle dans la formation de la MB. Trois semaines après leur naissance, les souris *Reln*<sup>-/-</sup> ont une diminution dramatique du recouvrement des collecteurs de la peau en Laminine- $\alpha 5$ . Le marquage du Collagène IV semble aussi plus faible (Lutter et al., 2012).

#### f. La maturation des capillaires.

Le phénotype capillaire requiert la formation de jonctions en bouton punctiformes, un ancrage correct dans la MEC et l'absence de recouvrement par des cellules murales. Le diamètre de ces vaisseaux varie entre 10 et 60  $\mu\text{m}$  et l'épaisseur de leur paroi est comprise entre 50 et 100 nm (Margaris and Black, 2012). Au cours de la maturation du réseau lymphatique, seuls les capillaires maintiennent un niveau d'expression élevé de Lyve1. Initialement, les capillaires lymphatiques sont liés entre eux par des jonctions continues, et avec leur degré de maturation, le nombre de ces

jonctions diminue, au profit des jonctions en boutons. A P7, 50% des jonctions des capillaires de la trachée sont des jonctions bouton, 90% après 1 mois et 100% à 2 mois et demi (Yao et al., 2012a).

La taille des capillaires semble être en partie contrôlée par la **signalisation AKT**, comme le suggère le diamètre anormalement faible des capillaires des souris *Akt1*<sup>-/-</sup> (Zhou et al., 2010). Au contraire l'absence de **signalisation PI3K** entraîne un élargissement des capillaires et une diminution du nombre de branchements (Gupta et al., 2007).

Le récepteur VEGFR-2 est également impliqué dans le développement du réseau lymphatique. Son activation spécifique par VEGF-E entraîne un élargissement des capillaires cutanés (Wirzenius et al., 2007).

Le fonctionnement correct des capillaires nécessite l'ancrage de leurs LEC à la MEC environnante par l'intermédiaire des filaments d'ancrages, et cela nécessite la présence d'**Emiline-1**. En l'absence de cette glycoprotéine qui s'associe aux fibres élastiques, les filaments d'ancrage sont moins nombreux et les LEC des capillaires ne semblent pas pouvoir assurer leur rôle d'entrée de la lymphe. Ces LEC présentent en effet des jonctions adhérentes et de multiples recouvrements les unes sur les autres. La densité et le diamètre des capillaires sont également plus importants chez les souris *Emilin*<sup>-/-</sup> (Danussi et al., 2008).

La signalisation réverse d'**EphrinB2** est nécessaire pour éviter un recouvrement anormal de capillaires par les SMC. Tandis que les LEC des collecteurs expriment EphrinB2 et son récepteur EphB4, les capillaires n'expriment qu'EphB4. Par analogie avec les veines et les artères, il est suggéré que la signalisation EphrinB2/EphB4 permet de différencier 2 phénotypes : dans le cas du réseau lymphatique, ce sont les phénotypes « capillaires » et « collecteurs » (Makinen et al., 2005). De manière similaire, les invalidations de **FOXC2** ou **D'ANG2** entraînent un recrutement anormal des péricytes au niveau des capillaires (Norrmen et al., 2009) (Dellinger et al., 2008).

La délétion spécifique de kinases impliquées dans la phosphorylation de la sphingosine inhibe la formation des jonctions button-like des capillaires. Cette observation plaide donc pour l'implication de la **sphingosine-1-phosphate** dans la maturation des capillaires (Pham et al., 2010).

### 3. Formation de la lymphe et flux dans le réseau lymphatique

Le réseau lymphatique mature permet de reconduire les fluides interstiels collectés jusqu'au réseau sanguin. Trois hypothèses ont été débattues pour expliquer la formation de la lymphe : le transport vésiculaire, le gradient de pression osmotique et le gradient de pression hydraulique. C'est la dernière hypothèse qui est la plus largement admise (Wiig and Swartz, 2012). Après s'être formée dans les capillaires, la lymphe est acheminée dans les collecteurs grâce à des compressions externes, au gradient pression ou encore grâce à un mécanisme d'aspiration (Wiig and Swartz, 2012).

Une fois la lymphe dans les collecteurs, son flux est assuré grâce aux contractions rythmiques des SMC des lymphangions, tandis que la présence des valves le long des collecteurs assure le caractère unidirectionnel de ce flux. Il est admis que les lymphangions se contractent d'une manière péristaltique, c'est-à-dire avec des contractions radiales se propageant le long du vaisseau (Margaris and Black, 2012). La contraction de VSMC se propage donc à l'image d'une vague, avec une vitesse de l'ordre de 4 à 8 mm/s. La coordination de cette propagation semble pour partie être liée à la présence de jonctions communicantes (« gap junctions ») (Zawieja et al., 1993).

La propulsion de la lymphe est affectée par des mécanismes intrinsèques et extrinsèques. Les premiers regroupent la pré-charge et la post-charge de chacun des lymphangions, la pression



transmurale, les forces de cisaillement, l'innervation et des facteurs circulants (prostaglandines, bradykinine, substance P) (Muthuchamy and Zawieja, 2008). Les mécanismes extrinsèques englobent la contraction des muscles squelettiques, la mobilité des organes à proximité ainsi que les pulsations artérielles. L'importance de ces 2 mécanismes l'un par rapport à l'autre n'est pas tranchée (Margaris and Black, 2012).

**Tableau 1 Modèles murins impliqués dans la maturation du réseau lymphatique**

Gène	Fonction	Phénotype lymphatique
<i>Akt1</i>	Ser/Thr kinase	Absence de développement des valves, diminution du nombre de LEC et du diamètre des vaisseaux, diminution du recouvrement des petits collecteurs par les SMC. (Zhou et al., 2010)
<i>Angpt2</i>	Facteur de croissance, ligand du récepteur TIE	Asci tes chyleuses, Chylothorax, Œdèmes, Absence de Valves (peau et mésentère), recouvrement normal de capillaires par SMC. Les souris <i>Ang2</i> <sup>-/-</sup> survivent jusqu'à l'âge adulte dans un fond C57BL/6, elles sont plus sensibles lorsqu'elles sont mixées avec 129/J. Le phénotype WT est largement restauré en exprimant ANG1 sous la dépendance du promoteur de <i>Ang2</i> . (Dellinger et al., 2008)
<i>Pi3kca</i> Mutations bloquant l'interaction avec Ras	Isoforme catalytique p110α de la PI3-kinase	Ascite chyleuse, le réseau est beaucoup moins branché et moins large. Très peu de souris survivent jusqu'à l'âge adulte, mais celles qui l'atteignent semblent en bonne santé. Le phénotype lymphatique n'est pas analysé en détail. (Gupta et al., 2007)
<i>Pik3r1</i>	Sous-unité régulatrice de PI3-kinase	Ascite chyleuse, les capillaires de la peau sont plus larges et moins branchés, les collecteurs du diaphragme sont moins branchés, absence de valves. Les souriceaux meurent 1 jour après la naissance. PI3K down-régule l'expression de l'Endogline. (Mouta-Bellum et al., 2009)
<i>Itga9</i>	Adhésion	Chylothorax, arrêt du développement des valves à l'étape de constriction, feuillets des valves court, cœur de matrice de la valve désorganisé ou absent. Les souris <i>Itga9</i> <sup>-/-</sup> meurent au cours de la période périnatale en lien avec des chylothorax. (Bazigou et al., 2009)
<i>FN-EIIIA</i>	Composant de la MEC, ligand de ITGA9	Recouvrement partiel du phénotype des <i>Itga9</i> <sup>-/-</sup> , le nombre de valves affecté de défaut d'élongation étant moins important que chez les <i>Itga9</i> <sup>-/-</sup> . (Bazigou et al., 2009)
<i>Emilin1</i>	Composant de la MEC	Les vaisseaux LYVE1-positifs sont plus nombreux et plus larges, dans la peau et l'intestin mais aussi dans les ganglions. Hyperplasie des vaisseaux, réduction du nombre de filaments d'ancrage et clapets entre les LEC des capillaires anormaux : jonctions adhérentes, chevauchement de plus de 2 LEC. Drainage moins efficace et fuite de lymph. (Danussi et al., 2008)
<i>Efnb2</i> (mutation du site de liaison au domaine PDZ)	Ligand transmembranaire du récepteur EphB4	Chylothorax, Absence de valves, Défaut de bourgeonnement des capillaires, défauts de drainage, recouvrement des capillaires par les SMC. Les souriceaux meurent dans les 3 semaines suivant la naissance, tandis que les EphrinB2 dont les tyrosines sont mutées en phénylalanines survivent jusqu'à l'âge adulte. (Makinen et al., 2005)
<i>Foxc2</i>	Facteur de transcription	Absence de maturation des collecteurs, défaut de bourgeonnement, recouvrement des capillaires par SMC, absence de valves, défauts de drainage. (Petrova et al., 2004) (Norrmen et al., 2009) (Dagenais et al., 2004)
<i>Nfatc1</i>	Facteur de transcription	Absence de Valves et vaisseaux élargis, recouvrement des capillaires par les SMC. L'inactivation de <i>Nfatc1</i> est létale au cours du développement embryonnaire, avant le remodelage. (Norrmen et al., 2009)
<i>Cx37</i>	Protéine des jonctions communicantes	Réduction du nombre de valves et absence de valves fonctionnelles due à un défaut de constriction dans les étapes initiales. Défauts de drainage lymphatique. (Sabine et al., 2012)
<i>Sema3A</i>	Ligand de la Plexine-A1 et de la NRP1	Aire des valves plus faible, valve recouverte par des SMC, défaut de drainage. (Bouvree et al., 2012)

<i>PlexinA1</i>	Récepteur de SEMA3A	Aire des valves plus faible. (Bouvree et al., 2012)
<i>Nrp1</i> (mutation du site de liaison à Sema3A)	Récepteur de SEMA3A	Aire des valves plus faible. (Bouvree et al., 2012)
<i>Reelin</i>	Glycoprotéine de la MEC	Maintien de l'expression de LYVE1 dans les collecteurs et diminution de leur recouvrement en SMC, diamètre irrégulier des collecteurs, diminution de la quantité de Laminine-α5. Phénotype restreint à la peau de l'oreille. Défaut de drainage lymphatique. (Lutter et al., 2012)
<i>Sphingosine kinase 1 et 2</i>	Enzyme produisant la sphingosine-1-phosphate.	Capillaires tortueux présentant du bourgeonnement (trachée et diaphragme). Jonctions en bouton moins nombreuses et plus diffuses. (Pham et al., 2010)
<i>Celsr1</i> et <i>Vangl2</i>	Composant de la voie de signalisation PCP	Absence de valves causée par une incapacité des cellules PROX1-positives à se réorienter perpendiculairement à l'axe du vaisseau (Tatin et al., 2013).

### III. Les pathologies lymphatiques humaines

Les pathologies associées au système lymphatique peuvent être consécutives à une insuffisance fonctionnelle (les lymphœdèmes) ou au contraire à une réactivation de la lymphangiogenèse (dissémination métastatique et inflammation).

#### 1. Les lymphoedèmes

Les lymphœdèmes correspondent à une dysfonction lymphatique conduisant à une accumulation progressive de fluides interstitiels dans le tissu conjonctif. Ils sont dits primaires quand une mutation génétique en est responsable. Ils sont dits secondaires lorsqu'ils sont consécutifs à un traumatisme initial (accident, chirurgie, infection grave, radiothérapie).

##### *Les lymphœdèmes primaires.*

Des mutations responsables de cette pathologie concernent des gènes dont le rôle a été discuté plus haut dans la partie consacrée au développement du réseau lymphatique (Tableau 2). Ces mutations pathologiques renforcent l'importance de ces gènes dans le développement correct du réseau lymphatique.

**Tableau 2 Mutations de gènes associées à des lymphœdèmes chez l'homme.**

Gène responsable	Nom de la maladie (n° OMIM)	Description
<i>FLT4</i> ( <i>VEGFR-3</i> )	Maladie de Milroy (153100) Hereditary lymphedema IA	Lymphœdème, ascite chyleuse causée par une hypoplasie des vaisseaux lymphatiques.
<i>GJC2</i> ( <i>connexin47</i> )	Hereditary lymphedema IC (613480)	Lymphœdème, déclenchement de la maladie entre 1 et 15 ans.
<i>FOXC2</i>	Lymphedema–distichiasis syndrome (153400/153300)	Déclenchement tardif d'un lymphœdème dans les membres inférieurs, associé à un distichiasis (cils surnuméraires dans l'épiderme des paupières). Le lymphœdème est causé par des défauts dans les valves.
<i>SOX18</i>	HLT syndrome (607823) Hypotrichosis–lymphedema–telangiectasia syndrome	Lymphœdème, Télangiectasies (dilatation des petits vaisseaux sanguins situés près de la surface de la peau et des muqueuses), Alopecie (chute des cheveux)
<i>CCBE1</i>	Hennekam lymphangiectasia-lymphedema syndrome (235510)	Lymphœdème, lymphangectasies intestinales (dilatation des vaisseaux lymphatiques de l'intestin), retard mental, anomalies faciales.
<i>PTPN14</i>	Lymphedema-choanal atresia syndrome (608911)	Lymphœdème déclenché au cours de l'enfance, atrésie des choanes (absence de communication entre la cavité nasale et le nasopharynx).
<i>ITGA9</i>	(Ma et al., 2008)	Chylothorax sévère

### *Les lymphœdèmes secondaires.*

Plus de 99% des cas de lymphœdèmes résultent d'un dommage aux vaisseaux lymphatiques. On peut noter l'obstruction par des parasites (Filariasis) qui est la 1<sup>ère</sup> cause de lymphœdème au niveau mondial. Dans les pays industrialisés, c'est le curage axillaire qui est responsable de la plus forte prévalence : 20 à 30% des femmes subissant cette chirurgie développent un lymphœdème. Dans ce contexte particulier, des stratégies thérapeutiques se développent avec pour objectif de favoriser la lymphangiogenèse et/ou la survie d'un ganglion lymphatique greffé en augmentant les taux de VEGF-C (Tammela and Alitalo, 2010).

## **2. Lymphangiogenèse inflammatoire**

Un processus de lymphangiogenèse a lieu sur les sites d'inflammation, principalement induit par le VEGF-C. En effet, de multiples types cellulaires sont capables de produire ce facteur de croissance en réponse à des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (Tammela and Alitalo, 2010). Cette lymphangiogenèse facilite la résolution de l'œdème tissulaire et participe à la réponse immunitaire en facilitant la mobilisation des macrophages et des cellules dendritiques. Les LEC des vaisseaux lymphatiques attirent les cellules immunitaires qui expriment le récepteur CCR7 et produisant son ligand, CCL21. Les cellules présentatrices d'antigènes entrent ensuite dans le ganglion lymphatique et se dirigent vers le compartiment lymphoïde où elles vont jouer leur rôle dans la réponse immunitaire. Les inflammations chroniques telles le psoriasis, ou la polyarthrite rhumatoïde sont également associées à de la lymphangiogenèse (Tammela and Alitalo, 2010).

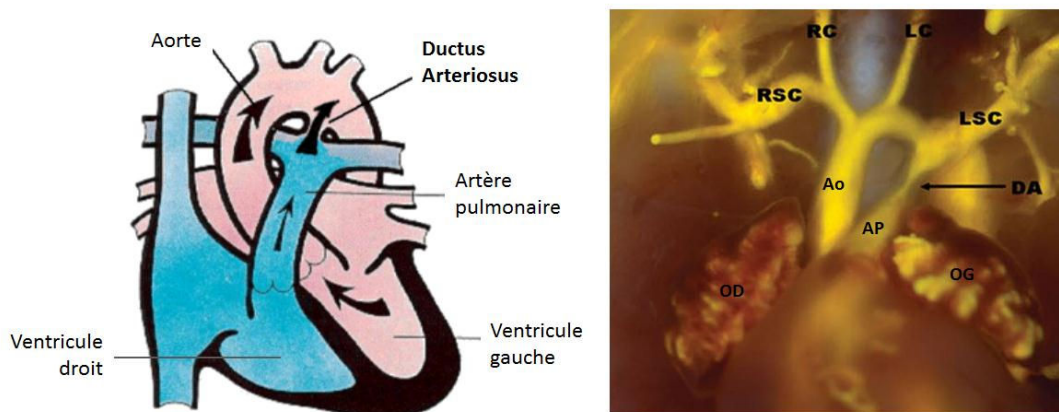
## **3. Lymphangiogenèse tumorale**

Les métastases dans les ganglions lymphatiques représentent la première étape de la dissémination tumorale dans de nombreux cancers, tels les carcinomes du sein, du colon ou de la prostate. La densité des vaisseaux lymphatiques tumoraux est corrélée à l'incidence des métastases ganglionnaires et à un mauvais pronostic, et l'étendue des métastases ganglionnaires est un déterminant majeur du pronostic et des décisions thérapeutiques (Tammela and Alitalo, 2010). Le réseau lymphatique intra-tumoral ne semble pas être fonctionnel à cause de la trop forte pression intra-tumorale. Au contraire les vaisseaux lymphatiques péri-tumoraux remplissent parfaitement leur fonction de drainage. La lymphangiogenèse tumorale est activée par des facteurs de croissance, dont VEGF-C et VEGF-D, produits par les cellules tumorales, les TAM (Tumor Associated Macrophages) et d'autres types cellulaires. En miroir, les LEC produisent des cytokines (telle CCL21) qui peuvent attirer les cellules tumorales (qui expriment CCR7, le récepteur de CCL21), de manière analogue à ce qui se produit pour les leucocytes dans la réponse inflammatoire (Tammela and Alitalo, 2010).

# Partie 3

## DUCTUS ARTERIOSUS

Le canal artériel ou Ductus Arteriosus (DA), est une artère permettant au flux sanguin de court-circuiter les poumons non fonctionnels du fœtus pendant la vie intra-utérine. Ce shunt se situe entre l'artère pulmonaire et l'aorte. Sa fermeture a lieu au moment de la naissance, dans des délais variables selon les espèces : de 1 à 3 heures chez la souris et de 24 à 48h chez l'homme. Au cours des semaines suivantes, le canal artériel se transforme en un ligament qui persiste au cours de la vie adulte sous le nom de Ligamentum Arteriosum. Le DA sera abordé par ses aspects embryologiques, ontogéniques et cliniques, ce qui permettra de saisir les enjeux et les déterminants de sa fermeture correcte à la naissance. Les bases moléculaires de la fermeture seront ensuite précisées ainsi que les pathologies congénitales en cause dans des défauts de fermeture du DA.

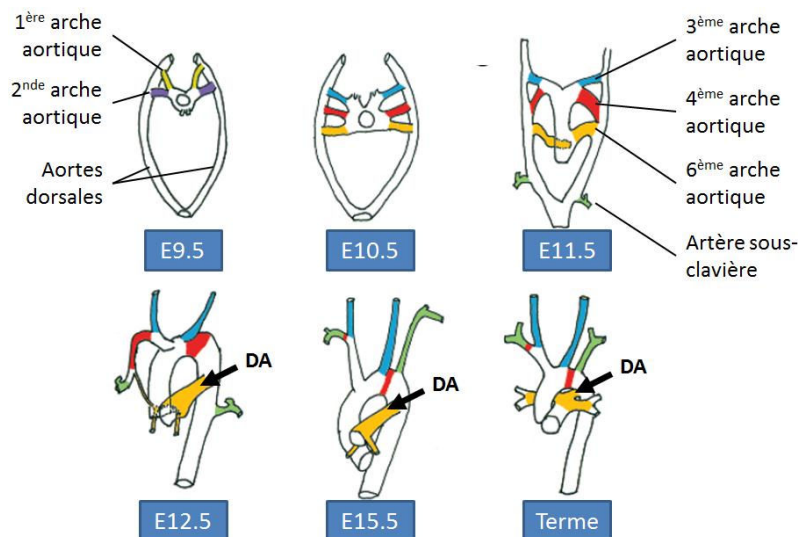


**Figure 34 Localisation du Ductus Arteriosus (DA) dans la circulation fœtale.**

Le DA permet de dévier le sang hors des poumons fœtaux non-fonctionnels. Sur la photo de droite, les vaisseaux ont été remplis de silicone jaune. OD/OG: oreillette droite/gauche, RC/LG: artère carotide commune droite/gauche, RSC/LSC: artère sous-clavière droite/gauche, Ao: aorte, AP: artère pulmonaire. D'après (Boucher et al., 2012).

### I. Ontologie, circulation fœtale et phylogénie

Au cours de l'embryogenèse, les 2 aortes dorsales sont reliées au cœur par un ensemble d'artères symétriques que l'on appelle les artères des arches aortiques (Cf Partie 1, III). Alors que le développement se poursuit, ces artères subissent un élégant remodelage vers l'asymétrie. Dans cette réorganisation, la 6<sup>ème</sup> artère gauche des arches aortiques persiste sous la forme du canal artériel (Figure 35) (Stoller et al., 2012). Chez la souris, le DA remplit sa fonction de déviation du flux sanguin hors des poumons à partir de E12.5 (Iida et al., 1997). Chez l'homme, c'est à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation que ce stade de développement est atteint (Schneider, 2012). Les cellules composant la paroi du DA sont dans leur immense majorité des cellules de muscle lisse issues de la crête neurale, et plus précisément des cellules de la crête neural vagale (Vagal Neural Crest Cell).



**Figure 35 Le remodelage des artères des arches aortiques.**

L'artère de la 6ème arche aortique gauche persiste au cours du développement embryonnaire et prend le nom de DA, à E12.5, lorsqu'elle permet de dévier le flux sanguin hors des poumons. La 5ème arche aortique ne se développe pas chez les vertébrés supérieurs. Les temps indiqués correspondent au modèle murin. La description du remodelage est valable chez les autres mammifères. Schéma adapté de (Iida et al., 1997).

Chez le fœtus à terme, le cœur droit éjecte dans l'artère pulmonaire les 2/3 du flux sanguin, le dernier tiers étant directement dévié dans l'oreillette gauche via le foramen ovale, un shunt cardiaque situé entre les deux oreillettes. Ce second shunt se ferme également après la naissance. Seul 10% du flux empruntant l'artère pulmonaire va passer par les poumons non-fonctionnels, la majorité du flux, soit 60%, empruntera donc le DA (Heymann and Rudolph, 1975). Dans la circulation fœtale, le flux sanguin dans le DA s'effectue dans le sens droite gauche. Ceci est causé, d'une part par la pression artérielle importante dans l'artère pulmonaire (liée à la contraction des artérioles pulmonaires), et d'autre part par la faible pression artérielle qui règne dans la circulation systémique, 50% du flux de l'aorte descendante étant déviés dans la circulation ombilico-placentaire à faible résistance. Après la naissance, ce gradient de pression s'inverse et le flux dans le DA change de sens en quelques minutes chez l'homme (Drayton and Skidmore, 1987).

### Données phylogénétiques

Le DA n'est pas une spécificité des mammifères, et c'est au contraire une structure anatomique très conservée parmi les vertébrés aériens, c'est-à-dire ceux possédant des poumons. Du point de vue de l'évolution, le passage de la vie aquatique à la vie terrestre s'est accompagné de nombreuses adaptations, dont le développement d'un nouvel organe : les poumons. Ce système respiratoire original a nécessité des adaptations du système circulatoire sanguin parmi lesquelles le DA. Sa fermeture permet la séparation des circulations systémiques et pulmonaires et ainsi la respiration aérienne.

L'exemple le plus frappant est celui des dipneustes (*Osteichthyes*, *Sarcopterygii*, *Dipnoi*) qui sont les plus primitifs des vertébrés à arborer des poumons et un DA. Cependant, ils possèdent également des branchies et sont capables de vivre tour à tour sous l'eau et sur terre. En fonction du type de respiration, aérienne par les poumons ou aquatique par les branchies, leur DA va alternativement se fermer et s'ouvrir. Mais pour tous les autres vertébrés terrestres, la fermeture du DA est définitive au moment de l'établissement de la respiration aérienne. Chez les amphibiens, les stades larvaires se développent dans un environnement aquatique et utilisent des branchies. Après la

métamorphose, leur DA se ferme et ils peuvent alors utiliser leurs poumons. Chez les reptiles et les oiseaux, le DA se ferme au moment de l'éclosion et chez les mammifères, au moment de la mise-bas (Bergwerff et al., 1999).

D'un point de vue phylogénétique, la mise en place du DA a permis le passage de la vie aquatique à la vie terrestre. C'est une caractéristique retrouvée au niveau ontogénétique chez les mammifères puisque la fermeture du DA est nécessaire à la transition entre vie intra-utérine aquatique et la vie postnatale aérienne.

## **II. Données cliniques humaines**

L'absence de fermeture du DA au moment de la naissance constitue une pathologie nommée PDA pour Persistent ou Patent Ductus Arteriosus. C'est une complication majeure de la prématurité, le taux de fermeture du DA étant inversement proportionnel à l'âge gestationnel et au poids à la naissance. A chaque semaine de gestation supplémentaire, le risque de PDA décroît de 9% (Hajj and Dagle, 2012). Parmi les enfants nés à terme, l'incidence du PDA est de l'ordre de 0,2%, ce qui représente 5 à 10% des pathologies cardiaques congénitales (Schneider, 2012). Alors que chez les prématurés la présence d'un PDA est liée à une immaturité développementale, chez les nouveau-nés à terme, cette pathologie est davantage causée par des anomalies génétiques. Elles peuvent être le résultat de syndromes génétiques complexes, ou être le fait de mutations d'un seul gène. Cette partie sur les causes génétiques des PDA chez l'homme sera développée plus loin. En plus des causes génétiques et de l'immaturité structurale, des facteurs infectieux peuvent être impliqués dans la survenue d'un PDA. La contraction de la rubéole en début de grossesse entraîne des malformations importantes chez le fœtus, dont la présence d'un PDA dans 25% des cas (Gittenberger-de Groot et al., 1980).

### ***Conséquence de la présence d'un PDA***

Le maintien du shunt ouvert après la naissance entraîne une inversion du flux sanguin dans le DA. On parle alors de shunt gauche-droit. Les conséquences sont une surcharge de sang dans les poumons et un travail accru du cœur gauche. Le travail ventilatoire va également augmenter du fait d'une moindre compliance pulmonaire. Les pathologies associées sont principalement les hémorragies intra-ventriculaires et les dysplasies broncho-pulmonaires qui sont liées à l'hypertension artérielle pulmonaire. Des œdèmes pulmonaires peuvent également survenir. Les entérocolites nécrosantes sont souvent associées, sans pour autant résulter directement des anomalies circulatoires. Toutefois, l'impact du PDA dépendra largement de l'importance du shunt, qui lui-même dépend du diamètre du DA et du gradient de pression entre les circulations systémiques et pulmonaires (Schneider, 2012). Les enfants présentant un large shunt vont développer une insuffisance cardiaque dans les 8 à 10 semaines suivant la naissance. Par contre, les patients avec un shunt modéré compensent relativement bien ce défaut au cours de l'enfance et de l'adolescence. L'insuffisance cardiaque survient alors souvent après 30 ans (Gournay, 2011).

### ***Diagnostic du PDA***

Les manifestations cliniques d'un PDA correspondent souvent aux symptômes associés à l'insuffisance cardiaque, à savoir un retard de croissance lié à des difficultés à se nourrir, la tachypnée (augmentation de la fréquence respiratoire) et la diaphorèse (augmentation de la sudation). Au cours de l'enfance et de l'adolescence, le PDA peut être diagnostiqué à la suite de l'évaluation d'un murmure cardiaque asymptomatique. L'échocardiogramme permet de confirmer le



diagnostic et d'évaluer l'impact du PDA grâce à la mesure de la taille de l'oreillette et du ventricule gauches. Le Doppler permet de détecter des tout petits shunts (Gournay, 2011).

### ***Traitement du PDA***

L'effet dilatateur des prostaglandines sur le DA a été découvert en 1973. Dès 1974 l'effet vasoconstricteur de l'indométacine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines sur la DA, a été décrit chez le rat (Sharpe et al., 1974), puis chez le mouton (Coceani et al., 1975). Et depuis la réalisation de 2 essais cliniques en 1976 (Stoller et al., 2012), le traitement du PDA repose sur l'administration d'indométacine ou d'ibuprofène qui sont des Anti-Inflammatoires Non Stéroïdien (AINS), inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines. L'objectif du traitement consiste à réduire les taux circulants de prostaglandines vasodilatatrices. Le traitement par l'indométacine a été historiquement le premier à être utilisé, mais il est actuellement remplacé par l'ibuprofène qui présente moins d'effets indésirables tout en ayant des taux de succès équivalents (Van Overmeire et al., 2000) (Thomas et al., 2005). Malgré des taux de fermeture de 70 à 80% après l'administration d'AINS, la stratégie de traitement demeure imparfaite et discutée, notamment chez les grands prématurés. Chez les enfants nés à terme, la fermeture peut être plus difficile à obtenir, et le taux de succès est dans ce cas seulement de 30% (Gersony et al., 1983). En absence de réponse au traitement par les AINS, la ligature chirurgicale est proposée. Des systèmes d'occlusion implantés par cathétérisme se développent également : ce sont par exemple les systèmes Nit-Occlud coil et Amplatzer duct occluder.

### ***Nécessité postnatale de maintien du shunt***

Au contraire de ce qui a été présenté jusque ici, certaines pathologies cardiaques congénitales graves requièrent le maintien du DA ouvert après la naissance. La survie du nouveau-né en dépend. Cette nécessité se rencontre dans les cas d'atrésie pulmonaire, de malformation de la crosse aortique et dans les cas de transposition des gros vaisseaux (Gersony, 1986). Dans ce cas, la stratégie consiste à administrer des agonistes des prostaglandines.

Le contrôle de l'état de fermeture et d'ouverture du DA est donc un enjeu important de la médecine néonatale humaine. La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiologie du DA est nécessaire et elle avance principalement grâce à des modèles animaux. Ces mécanismes seront décrits dans les paragraphes suivants.

## **III. Maintenance de l'ouverture in utero.**

Le DA possède un tonus intrinsèque, et c'est donc par des mécanismes vasodilatateurs actifs qu'il est maintenu ouvert.

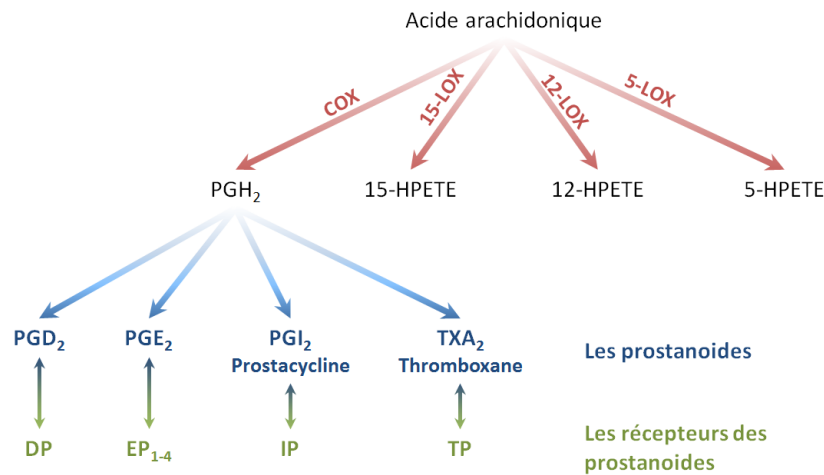
### **a. Les prostaglandines**

#### ***Les prostaglandines de la série E***

Le plus important système vasodilatateur du DA est celui des prostaglandines PGE1 (Prostaglandine E1) et PGE2, qui montrent toutes deux globalement la même efficacité (Coceani and Olley, 1973). Leur action s'effectue par les récepteurs EP, des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, dont il existe 4 sous-types (EP 1 à 4) (Figure 36). C'est le récepteur EP4 qui est reconnu comme étant celui permettant la vasodilatation du DA (Smith et al., 1994). Les effets sont obtenus dès des concentrations de l'ordre du picomolaire et sont médiés par l'augmentation



intracellulaire d'AMPC (AMP cyclique). Le taux de PGE2 augmente au cours de la gestation pour atteindre 1 à 2 nM à terme chez le fœtus de mouton (Clyman et al., 1980). La source majeure de cette molécule est le placenta et son site principal de dégradation est pulmonaire avec une production importante de la PGDH (Prostaglandine déshydrogénase) dans cet organe.



**Figure 36 Métabolites de l'acide arachidonique (AA).**

L'AA contenu dans les membranes plasmiques sous forme de triglycérides est libéré par des phospholipases.

L'AA libre devient le substrat d'enzymes à activité cyclo-oxygénase (COX) ou lipoxygénase (LOX). Dans le premier cas, le produit sera la prostaglandine H2 (PGH2) dont les métabolites constituent le groupe des prostanoides. Dans le second cas, les LOX produisent des dérivés des HPETE

(HydroxyPeroxyEicosaTétraNoïque) dont les leucotriènes. Les récepteurs des prostanoides sont typiquement nommés par 2 lettres : la 1<sup>ère</sup> pour le nom de la série en question et la 2<sup>nde</sup> le P de Prostanoid. Schéma adapté de (Calder, 2005).

### **Les prostacyclines : PGI2**

L'effet de PGI2 sur la vasodilatation du DA est bien moins important que celui de PGE2, de l'ordre de 1000 fois, mais le DA possède néanmoins des récepteurs IP (Smith, 1998). Cependant, les PG auxquelles est exposé le DA peuvent être produites localement ou être circulantes. Pour ce qui est de la production locale, PGI2 est le principal produit de l'acide arachidonique (90% des PG) et PGE2, PGF2a, PGD2 sont produits en faibles quantités (Figure 36). (Étude chez les ovins et les bovins, (Terragno et al., 1977)). Cette production locale est donc en faveur d'un rôle de PGI2 sur la physiologie ductale.

### **b. Le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO)**

Le NO est un acteur accessoire de la dilatation du DA in utero car il est incapable de compenser l'absence des PG. Cependant les donneurs de NO (Sodium NitroPrusside et Glyceryl trinitrate) ont un effet dilatateur sur le DA, tandis que les inhibiteurs de la NO synthase sont contractants du DA (Smith, 1998). De plus, les effets vasodilatateurs du NO sur le DA diminuent avec l'avancée de la gestation (Etude réalisée chez le poulet, (Agren et al., 2008)).

Le DA contient des enzymes capables de produire du CO : les hèmes oxygénase-1 et -2 dans les CE et les VSMC. Ce CO induirait la vasodilatation du DA soit par production de GMPc (GMP cyclique), soit par ses effets sur les canaux potassium. L'inhibition de l'hème oxygénase est capable de contracter le DA in vitro (Cocceani et al., 1997). Mais à l'instar du NO, le CO est un acteur mineur de la vasodilatation du DA.

## IV. Mécanisme de fermeture

Deux phases sont classiquement décrites. La première, provisoire, est appelée fermeture fonctionnelle, elle correspond globalement à la vasoconstriction du DA. La seconde est définitive, c'est la fermeture anatomique qui coïncide avec le remodelage de l'ancien vaisseau en un ligament, le ligamentum arteriosum. Dans la suite de cette introduction, le terme de fermeture fonctionnelle correspondra à l'étape de vasoconstriction et celui de fermeture anatomique comprendra l'ensemble des remodelages cellulaires, qu'ils aient lieu avant ou après l'étape de vasoconstriction.

### 1. La fermeture fonctionnelle :

La contraction du DA à la naissance est la résultante d'une diminution des taux de molécules vasodilatrantes et d'une augmentation de la pression partielle en oxygène ( $PO_2$ ). Ces 2 grands systèmes agissent en synergie pour promouvoir la fermeture du DA. D'autres molécules vasoconstrictrices participent également à la fermeture fonctionnelle, sans pour autant en être des acteurs majeurs.

#### a. La chute des taux de PG à la naissance

Les taux de  $PGE_2$  chutent de l'ordre de 20 fois dans les heures suivant la naissance (Clyman et al., 1980). Cette diminution résulte de la disparition de leur source principale, le placenta, et de l'augmentation du débit sanguin pulmonaire, le lieu majeur du catabolisme des PG, par la prostaglandine déshydrogénase (PGDH). L'inversion du sens du flux dans le DA au moment de la naissance, qui cause une augmentation du débit pulmonaire, permet d'augmenter le volume sanguin subissant ce catabolisme.

Paradoxalement, l'augmentation de  $PO_2$  entraîne une augmentation locale de la production de  $PGE_2$  par le DA (Clyman et al., 1980) (Coceani et al., 1986). De façon concordante, il a aussi été observé une augmentation de COX2 dans le DA dans les heures suivant la naissance au niveau protéique (Trivedi et al., 2006). Cette contradiction est explicable de 2 façons. D'une part, la  $PGE_2$  peut agir sur son récepteur EP3, ce qui provoque une vasoconstriction (Smith and McGrath, 1995). L'expression de EP3 augmenterait et celle de EP4 diminuerait chez les lapins à terme (Fan et al., 2010). D'autre part, l'augmentation de la  $PO_2$  est concomitante à une inhibition de  $PGI_2$  synthase, ce qui peut conduire à une accumulation de  $PGH_2$  (Figure 36). Or, cet intermédiaire est une molécule vasoconstrictrice, car elle est un agoniste endogène des récepteurs TP (récepteurs du thromboxane) (Yokota et al., 2012).

#### b. L'augmentation de la pression partielle en oxygène ( $PO_2$ )

La  $PO_2$  au cours de la vie fœtale est de l'ordre de 18 à 28 mmHg (Heymann and Rudolph, 1975) contre 80 à 100 mmHg chez l'adulte. Alors que les effets vasoconstricteurs de l'augmentation de la  $PO_2$  sur le DA sont connus depuis les années 1950, les mécanismes moléculaires sous-jacents ne font toujours pas l'objet d'un consensus.

### Deux modèles pour expliquer la détection de l'O<sub>2</sub>.

*Statut Redox :*

Dans ce modèle, les canaux potassium redox-dépendants sont inhibés par des dérivés oxygénés (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène) produits par la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie. In vivo, il semble acquis que l'inhibition de composants de la chaîne de

transport des électrons affecte le tonus du DA. Les controverses existent cependant sur la nature exacte du signal, sur ses cibles et sur le timing de la réponse (Stoller et al., 2012). Il apparaît que la production de dérivés oxygénés est dépendante d'un processus de fission mitochondriale. La fragmentation des mitochondries est nécessaire à l'augmentation du métabolisme oxydatif dans les SMC du DA et nécessite l'activation de DRP1 (dynamin related protéin 1), une protéine GTPase clef du processus de fission (Hong et al., 2013). La dépolarisation de la VSMC est également liée à l'inhibition des canaux potassium voltage-dépendants (« delayed rectifier potassium channels ») et ATP-dépendants du DA. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture des canaux calcium voltage-dépendants, l'entrée du calcium et la contraction.

#### *Cytochrome P450 :*

Coceani et ses collègues ont largement étudié la détection de l'O<sub>2</sub> par des membres de la famille des cytochromes P450. Ils proposent que les métabolites de l'AA, produits par les activités lipoxigénase et monooxigénase des cytochromes P450 (Figure 36), constituent l'étape initiale de détection de l'O<sub>2</sub>. Elle serait suivie par une augmentation de la production par les CE d'endotheline-1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur, qui agirait ensuite sur les VSMC via le récepteur ETA (Stoller et al., 2012).

La maturation du système de détection de l'O<sub>2</sub> dans le DA s'effectue en fin de gestation. La maturation de ce système peut être accélérée par l'administration maternelle de Vitamine A (Wu et al., 2001).

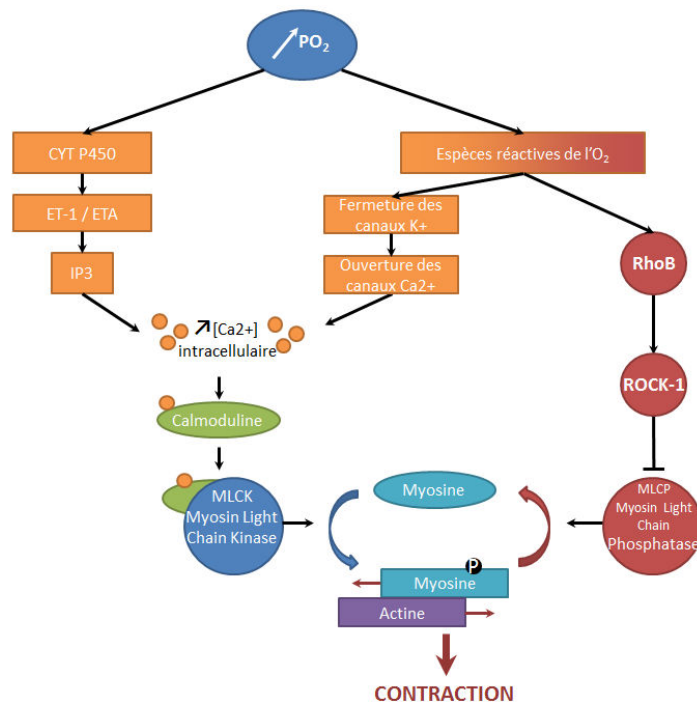
#### **L'augmentation de calcium intracellulaire.**

Le calcium extracellulaire est le principal contributeur à l'augmentation de calcium intracellulaire. Les canaux calcium de type L font consensus pour leur implication dans l'entrée de calcium. Récemment, la participation des canaux de type T à ce processus a également été démontrée (Stoller et al., 2012).

Les réserves de calcium intracellulaire peuvent aussi être mobilisées, notamment à la suite de la production d'ET-1. Elle va agir sur les récepteur ETA des VSMC, ce qui va mobiliser la voie IP3 et in fine la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique (Figure 37) (Yokoyama et al., 2010a).

#### **La sensibilisation au Calcium.**

Le système Rho kinase est impliqué dans la sensibilisation au calcium. Il intervient pour réguler l'équilibre entre la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) et la MLCP (Myosine Light Chain Phosphatase). C'est un système indépendant des canaux Calcium et Potassium qui initie la contraction en inhibant la MLCP. Dans les artères pulmonaires, l'hypoxie induit la forme active de RhoA, qui à son tour active ROCK qui va inhiber la MLCP et par conséquent prolonger la contraction. Au contraire, dans le DA, la vasoconstriction s'effectue suite à l'activation de RhoB et de ROCK-1 (Rho-associated protein kinase 1) en réponse à une augmentation de PO<sub>2</sub> (Figure 37) (Kajimoto et al., 2007).



**Figure 37 La détection de l'O<sub>2</sub> et la sensibilisation au calcium des VSMC du DA**  
Schéma adapté de (Kajimoto et al., 2007).

### c. Autres mécanismes

Les prostaglandines sont impliquées dans la vasoconstriction du DA. En effet, les récepteurs TP et EP3 sont exprimés dans le DA, et en présence d'agonistes de ces récepteurs, le DA se contracte. Les cellules de l'adventice sont capables de produire des substances vasoconstrictrices, comme l'histamine (Smith, 1998).

L'angiotensine II pourrait être impliquée dans la fermeture du DA. En effet, l'inhibition de l'ACE (Agiotensin Converting Enzyme) par l'Enalapril est responsable d'un délai dans la fermeture du DA et de sa réouverture lorsqu'il est administré 3h après la naissance (Takizawa et al., 1994). Cependant les effets de cette enzyme n'ont pas été étudiés en post-natal. Le DA se contracte également en réponse à la bradykinine et l'adrénaline via des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques (Smith, 1998).

Une composante neurale est aussi impliquée dans la fermeture fonctionnelle. Le DA est innervé par des fibres nerveuses contenant des catécholamines. Le DA se contracte en réponse à la noradrénaline. Le DA est aussi innervé par des fibres contenant de l'acétylcholine et il se contracte en réponse à cette substance (Smith, 1998).

### d. Présence de VSMC contractiles dans le DA :

Le prérequis indispensable à la fermeture du DA à la naissance est la présence dans ce vaisseau de VSMC contractiles. Cet aspect est souligné par la présence de PDA dans des modèles murins présentant une défaillance dans la synthèse de protéines contractiles des VSMC. Il sera discuté en détails dans le paragraphe consacré aux modèles murins de PDA.

### e. L'implication des plaquettes

Le groupe du Dr. Massberg a mis en évidence en 2010 l'implication des plaquettes dans la fermeture fonctionnelle du DA. Des modèles murins de défaut d'agrégation plaquettaire présentent

en effet des PDA (Echtler et al., 2010). Malgré des modèles murins convaincants, l'implication des plaquettes dans la fermeture du DA reste très discutée, notamment chez l'humain.

Les auteurs suggèrent que les plaquettes pourraient intervenir à 2 niveaux. Le premier serait celui de la simple obstruction mécanique avec la formation du thrombus. A l'appui de cette hypothèse, ils montrent par microscopie intravitale le recrutement des plaquettes dans le DA en train de se fermer. Le second niveau serait celui d'une implication des plaquettes dans le remodelage de la paroi puisque les plaquettes favorisent la migration et la prolifération des vaisseaux lésés. Cet aspect sera discuté dans le paragraphe suivant consacré à la fermeture anatomique du DA et aux remodelages cellulaires qui lui sont associés.

## 2. La fermeture anatomique

D'une artère convoyant 60% du flux sanguin total pendant la vie fœtale, le DA va devenir une structure close de manière permanente, le ligamentum arteriosum. Les remodelages vont donc être importants. Le terme de fermeture anatomique regroupe ces processus de remodelage qui se déroulent avant et après la naissance.

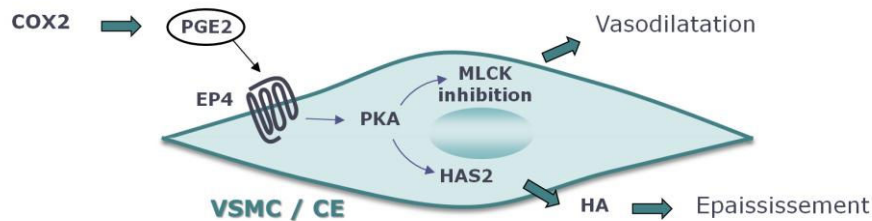
La description des remodelages anténataux peut être différente en fonction des espèces, notamment en fonction de leur taille (Bergwerff et al., 1999). De manière générale, l'étape importante est la formation d'un coussin intimal (« intimal cushion ») caractérisé par (1) l'épaississement de la région sous-endothéliale (SE) par dépôt de matrice extracellulaire, (2) le désassemblage de la lame élastique interne (IEL) et la perte des fibres élastiques dans la media et (3) la migration dans la région SE de VSMC en provenance de la media. Les remodelages postnataux mènent à la transformation en ligament, notamment par de la fibrose (Yokoyama et al., 2010a).

### a. Epaississement de la région sous-endothéliale

Cet épaississement est décrit comme étant indispensable à la fermeture fonctionnelle. Cependant, il est variable en importance en fonction des espèces. Chez les mammifères tels que l'homme, le mouton ou le chien, l'épaississement est très important et commence tôt dans la période de gestation. Au contraire, chez les petits animaux, il peut être beaucoup moins évident à trouver. Chez la souris, l'étude histologique du DA ne décrit pas cet épaississement (Tada and Kishimoto, 1990). Il faut noter que l'épaississement de l'intima est souvent peu présent chez les patients présentant un PDA et dans les modèles animaux de cette pathologie (Gittenberger-de Groot et al., 1980) (Gittenberger-de Groot et al., 1985). Cela souligne l'importance de ce processus dans la physiologie de fermeture du DA.

Comme décrit plus haut, PGE2 est un puissant vasodilatateur par son action sur le récepteur EP4. La liaison entraîne l'augmentation cytoplasmique de cAMP, ce qui inhibe en aval la MLCK et in fine conduit à la relaxation du DA (Figure 38). Mais de manière paradoxale, les souris *Ep4-KO* présentent un PDA et meurent rapidement après la naissance (Nguyen et al., 1997) (Segi et al., 1998). C'est également le cas des souris *Cox2-KO* (Loftin et al., 2001) (Loftin et al., 2002). Ce paradoxe a été résolu en 2006 par le groupe d'Ishikawa (Yokoyama et al., 2006). Les auteurs montrent que la signalisation PGE2-EP4 possède un autre rôle que celui de vasodilater. Cette signalisation conduit à une augmentation de l'expression de l'ARNm de la *Has2* (hyaluronic acid synthase 2) et à une

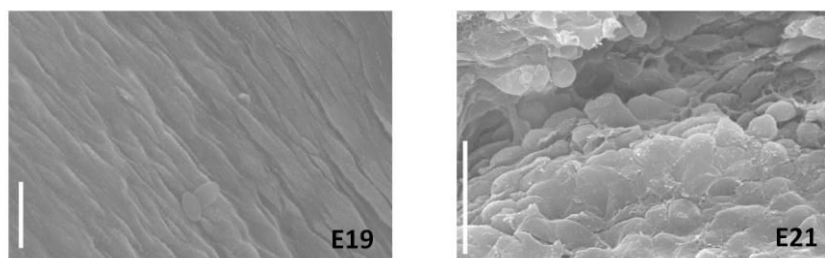
augmentation du dépôt d'acide hyaluronique (HA) dans le DA. L'accumulation de HA dans la région sous-endothéliale constitue un signal pour la migration des VSMC dans cet espace, ce qui participe à l'épaississement sous-endothélial (Figure 38). La signalisation PGE<sub>2</sub>-EP4 possède donc 2 rôles essentiels dans la physiologie du DA, à savoir, la vasodilatation et l'épaississement.



**Figure 38 Les 2 rôles de PGE<sub>2</sub> dans la physiologie du DA: Vasodilatation et Epaississement**  
Schéma adapté de (Yokoyama et al., 2006).

Le groupe d'Ishikawa a également exploré plus en détail la voie de signalisation PGE<sub>2</sub>-EP4-AC-cAMP-PKA (Adénylate Cyclase - AMP cyclique – Protéine Kinase A). Ils ont notamment cherché à savoir quelle isoforme d'AC, parmi les 9 décrites, était impliquée dans cette cascade. Il ressort de leur étude que l'AC6 et l'AC2 sont davantage exprimées dans le DA que dans l'aorte. L'AC6 est indispensable à l'IT causé par l'augmentation de production de HA induit par PGE<sub>2</sub> (Yokoyama et al., 2010b). Ce groupe a également étudié la voie de signalisation PGE<sub>2</sub>-EP4-AC-cAMP-EPAC. L'EPAC est une protéine activée par l'cAMP, c'est une « guanine nucleotide exchange protein » qui régule l'activité des petites protéines G, dont il existe 2 isoformes. Elles sont toutes les 2 surexprimées pendant la période périnatale, mais seule EPAC1 est impliquée dans l'IT en favorisant la migration des VSMC, sans pour autant augmenter la production de HA. Plus précisément EPAC1 améliore l'organisation des fibres de stress d'actine et augmente les adhésions focales des VSMC du DA (Yokoyama et al., 2008). En définitive, la production de HA et la migration des VSMC induites par PGE<sub>2</sub> suivent des voies différentes à partir de l'cAMP.

Bien que les données sur le rôle de EP4 dans la production d'HA et dans la migration des VSMC soient convaincantes, des points restent sujets à discussion. Les auteurs décrivent in vivo le rôle de EP4/HAS2/HA dans la formation de coussin intimal en s'appuyant notamment sur des données murines. Or, il est décrit que les souris ne forment pas de coussin intimal comme cela est décrit pour des espèces plus grandes. Chez la souris, un épaississement est difficilement discernable du chevauchement des cellules endothéliales qui s'opère au moment de la vasoconstriction lorsque le diamètre du lumen se réduit (Stoller et al., 2012). Par ailleurs, en fin de gestation, la couche de cellules endothéliales du DA présente une surface irrégulière, avec des protrusions de CE et des CE qui s'arrondissent et se détachent de la membrane basale (Agren et al., 2008). Cette modification de l'endothélium peut aussi être envisagée comme un épaississement.



**Figure 39 Evolution de l'endothélium du DA en fin de développement embryonnaire.**  
Microscopie électronique à balayage de l'endothélium du DA de poulet, côté pulmonaire. On note que les EC prennent une forme cuboïdale et forment des protrusions à l'intérieur du lumen. La durée d'incubation des embryons de poulet est de 21 jours. Barre d'échelle: 20µm. (Agren et al., 2008).

En parallèle de la production de HA, les VSMC du DA produiraient 2 fois plus de fibronectine que l'aorte (Rabinovitch, 1996). Cette production de fibronectine semble être un processus important dans l'épaississement de l'intima. En effet, le blocage de la production de fibronectine empêche l'épaississement et est *in fine* responsable d'un PDA chez le mouton (Mason et al., 1999). Par ailleurs, le TGFβ et le NO induisent la production de MEC, et en particulier celle de HA et de fibronectine (Rabinovitch, 1996).

#### **b. Désassemblage de l'IEL et perte des fibres élastique dans la media.**

La fragmentation de la lame élastique interne et la présence de fibres élastiques disparates sont décrites pour être des caractéristiques importantes du remodelage du DA. La diminution de l'élastogénèse au cours de la période périnatale coïncide avec l'augmentation de la migration et de la prolifération des VSMC. Au contraire, en cas de PDA, la lame élastique interne reste intacte et les VSMC migrent faiblement dans l'intima (de Reeder et al., 1990) (Slomp et al., 1992) (Hinek et al., 1991). A titre d'exemple, la souche de rat Brown Norway, qui est touchée par des taux importants de PDA, présente une quantité importante de fibres élastiques dans l'intima et trop peu dans la média (Bokenkamp et al., 2006). Cette distribution anormale de l'élastine suggère que des dérégulations du métabolisme de l'élastine peuvent être à l'origine de PDA.

#### **c. Migration et prolifération des VSMC**

L'épaississement de la région sous endothéliale et la fragmentation de la lame élastique interne vont créer un environnement favorable à la migration de VSMC. Encore faut-il pour cela que ces cellules modifient leur phénotype et acquièrent des capacités migratoires.

Les VSMC gardent au cours de leur vie la possibilité de varier de phénotype en fonction de différents stimuli. Cette plasticité leur permet de fluctuer d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique. Les VSMC contractiles expriment, comme leur nom l'indique, des protéines contractiles permettant d'établir et de maintenir leurs structures myofilamenteuses. Parmi ces protéines contractiles, on retrouve SM22α, SMA et SMMHC. Au contraire, les VSMC synthétiques produisent des composants de la MEC au détriment des protéines contractiles. Elles possèdent également des taux de migration et de prolifération plus importants (Yoshida and Owens, 2005).

La physiologie du DA met en jeu les 2 phénotypes, sans que leur proportions respectives soit connues. La nécessité du phénotype contractile semble évidente puisque le DA doit se contracter à la naissance et le rester le temps que la fermeture anatomique soit définitive. Le phénotype synthétique est lui aussi indispensable à la migration des VSMC. La transformation ultérieure en



ligament nécessite également la production de MEC, dont on peut penser qu'elle soit en partie produite par les VSMC.

#### **d. Le remodelage en ligament**

Le processus de remodelage en ligament est peu documenté. Une étude histologique de la fermeture du DA a été réalisée chez la souris entre E15 et 4 mois après la naissance (Tada and Kishimoto, 1990). Trois heures après la naissance, alors que le DA est fermé, les cellules à l'intérieur de la lame élastique interne sont rondes ou cuboïdales et arrangées de manière dense et compacte (Tada and Kishimoto, 1990). Ces cellules n'expriment pas toutes les mêmes protéines 1h après la naissance : celles qui bordent la lame élastique interne expriment CD31 et la VE-cadhérine et représentent donc les anciennes CE, tandis que celles du centre de l'ancien lumen n'expriment pas ces marqueurs endothéliaux (Echtler et al., 2010).

Des cellules situées à l'intérieur de la lame élastique interne ainsi que des VSMC à l'extérieur sont en prolifération. La prolifération des cellules à l'intérieur de l'ancien lumen semble être importante puisque la présence d'un PDA peut être associée à réduction du nombre de cellules à l'intérieur de la lame élastique interne (Echtler et al., 2010). Ces phénomènes de prolifération sont retrouvés chez le porc, mais pas dans les mêmes zones du DA. Entre la naissance et 1 jour, de la prolifération est notée dans l'adventice et la partie externe de la média, tandis qu'à 3 jours, des cellules en prolifération sont retrouvées dans tout le DA (Tananari et al., 2000).

A partir de 3 jours, chez la souris, les cellules à l'intérieur de la lame élastique interne se dissocient les unes des autres tandis que des dépôts de MEC s'effectuent. Des dépôts de collagène sont retrouvés 3 semaines après la naissance, en parallèle de la formation de nouvelles fibres élastiques dans l'intima. Le nombre de cellules diminue progressivement et l'ancien DA devient plus fin (Tada and Kishimoto, 1990). Un jour après la naissance, chez le porc, l'apoptose touche l'ensemble du DA (fermé) puis elle se restreint à la zone de l'intima et de la partie interne de la média 3 jours après la naissance (Tananari et al., 2000).

Les aspects de prolifération ont été mis en évidence par le groupe de Clyman comme étant une conséquence de l'induction du VEGF suite à l'hypoxie causée par la fermeture du DA. Ce groupe utilise des mammifères de grande taille et montre que l'induction du VEGF favorise la prolifération néointimale et l'angiogenèse dans les vasa vasorum (Clyman et al., 2002).

Les BMP n'ont jamais été impliquées dans la fermeture du DA. Par contre l'implication de TGF $\beta$  dans la physiologie du DA est documentée, en utilisant le mouton comme modèle. La production de TGF $\beta$ , qui serait davantage présent dans le DA que dans l'aorte, augmenterait au moment de la mise-bas et au cours des 10 jours suivants. Le TGF $\beta$  inhiberait la migration des VSMC du DA tout en favorisant la production de MEC par les CE (Boudreau et al., 1992) (Tannenbaum et al., 1996) (Tannenbaum et al., 1995). Ces travaux sont peu repris dans la littérature. Pour autant, le TGF $\beta$  est impliqué dans une pathologie humaine incluant des PDA : le syndrome de Loeys Dietz, causé par des mutations des récepteurs du TGF $\beta$ , le TGFBR1 et le TGFBR2.

## V. Les modèles animaux de PDA.

Certaines races de chiens et de rats sont connues pour présenter des taux importants de PDA. Mais les souris KO restent un modèle de choix pour l'étude de la fermeture du DA. Ces invalidations peuvent être regroupées en 3 grandes catégories :

- Les invalidations touchant à la voie des prostaglandines,
- Celles impliquées dans la maturation des VSMC du DA,
- Et quelques autres invalidations.

### 1. La voie des prostaglandines

Les invalidations de gènes impliqués dans la voie de synthèse et de signalisation des prostaglandines conduisent à des problèmes de fermeture du DA à la naissance (Tableau 3). Comme décrit précédemment, les PG ayant un double rôle, dans la vasodilatation et dans l'épaississement, c'est finalement sur cette dernière fonction que l'invalidation aura le plus d'impact. Les gènes *Ptgs1* et *Ptgs2* codent pour les enzymes **COX1** et **COX2** qui catalysent la production de PGH<sub>2</sub> à partir de l'acide arachidonique. L'absence de *Cox1* n'affecte pas la fermeture du DA, au contraire de celle de *Cox2* qui entraîne une mortalité de 35 à 57%, en conséquence de la présence d'un PDA (Loftin et al., 2001) (Loftin et al., 2002) (Yu et al., 2006). L'incidence du PDA chez les souris *Cox2*<sup>-/-</sup> augmente avec la délétion hétérozygote de *Cox1* (80% de mortalité). La délétion homozygote des 2 isoformes est létale dans les 2 jours qui suivent la naissance. Le fait que les fœtus arrivent à terme en absence de *Cox1* et *Cox2* fœtal suggère que les prostanoïdes d'origine fœtale ne sont pas indispensables au maintien de l'ouverture du DA in utero.

La mutation de la tyrosine 385 de *Cox2* en une phénylalanine ne cause pas de PDA, bien que cette tyrosine soit impliquée dans les premières étapes de cyclooxygénation de l'AA. L'explication résiderait dans la formation d'un hétérodimère COX1/COX2 qui permet de compenser la perte de fonctionnalité de COX2. A l'appui de ce résultat, les souris *Cox1*<sup>-/-</sup> ; *Cox2*<sup>Y385F/Y385F</sup> présentent tous un PDA (Yu et al., 2006).

PGE<sub>2</sub> exerce ses effets via l'activation du récepteur **EP4**, encodé par le gène *Ptger4*. L'invalidation de ce gène, de la même manière que celle de *Cox2*, est associée à une létalité postnatale consécutive d'un PDA dans les jours suivant la naissance (Nguyen et al., 1997) (Segi et al., 1998) (Schneider et al., 2004).

Au moment de la naissance, la chute des taux de PG participe largement à la vasoconstriction du DA. L'invalidation des protéines impliquées dans cette diminution entraîne logiquement des PDA. C'est le cas du gène **Hpgd** (hydroxyprostaglandin deshydrogenase) qui code pour l'enzyme permettant d'inactiver les PG, la PGDH (prostaglandine deshydrogénase). Elle permet de convertir PGE<sub>2</sub> en 15keto-PGE<sub>2</sub>, un métabolite moins actif (Coggins et al., 2002) (Roizen et al., 2008). Tous les souris *Hpgd*-KO meurent dans les 48h suivant leur naissance.

La terminaison de la signalisation PGE<sub>2</sub> est aussi liée à sa prise en charge par le transporteur **PGT** (prostaglandine transporteur), qui est encodé par le gène *SLCO2A1*. A l'instar de la PGDH, le PGT est fortement exprimé dans les poumons, et la prise en charge de PGE<sub>2</sub> par PGT constituerait l'étape limitante de la dégradation des PG (Nomura et al., 2004). L'ensemble des souris invalidées pour *SLCO2A1* meurt dans les 2 jours suivant la naissance (Chang et al., 2010).

**Tableau 3 Invalidation murine des composants de la voie des prostaglandines et conséquences sur la survenue d'un PDA**

	Symbole et Nom du gène	Génotype	% PDA	% mortalité néonatale	Référence
<b>Cox-1</b> <b>Ptgs1</b>	Cyclooxygenase-1 Prostaglandin G/H synthase 1	<i>Cox1</i> -/-	0	3	(Loftin et al., 2001)
<b>Cox-2</b> <b>Ptgs2</b>	Cyclooxygenase-2 Prostaglandin G/H synthase 2	<i>Cox2</i> -/-	33	35	
		<i>Cox1</i> +/- <i>Cox2</i> -/-	74	79	
		<i>Cox1</i> -/- <i>Cox2</i> -/-	100	100	
<b>Cox-2</b> <b>Ptgs2</b>	Cyclooxygenase-2 Prostaglandin G/H synthase 2	<i>Cox2</i> -/-	40	57	(Yu et al., 2006)
<b>Cox-2</b> <b>Ptgs2</b>	Cyclooxygenase-2 Prostaglandin G/H synthase 2, mutation de la tyrosine 385 impliquée dans le site enzymatique.	<i>Cox2</i> <sup>Y385F/Y385F</sup>	0	5	
		<i>Cox1</i> -/- <i>Cox2</i> <sup>Y385F/Y385F</sup>	100	100	
<b>Ptger4</b>	Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype	<i>Ep4</i> -/-	>95 100	>95 100	(Nguyen et al., 1997) (Segi et al., 1998) (Schneider et al., 2004)
<b>Slco2a1</b>	Solute carrier organic anion transporter family member 2A1 Prostaglandin transporter	<i>Pgt</i> -/-	100	100	(Chang et al., 2010)
<b>Hpgd</b>	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)] Prostaglandin dehydrogenase 1	<i>Pgdh</i> -/-	100	100	(Coggins et al., 2002) (Roizen et al., 2008)

## 2. La maturation des VSMC

Les invalidations touchant les VSMC concernent les facteurs de transcription (Myocardine, TFAP2B et BRG1), les éléments contractiles de la cellule (SM-MHC), ou encore la communication intercellulaire/MEC (JAG1 et ILK). Ces invalidations sont regroupées dans le Tableau 4.

**La myocardine** est un coactivateur transcriptionnel exprimé dans les cardiomyocytes et les SMC (Smooth Muscle Cells) et régulant l'expression de protéines contractiles. Pour cibler les VSMC dérivées de la crête neurale (celles qui peuplent le DA), les souris utilisées expriment la recombinaison CRE sous le contrôle des promoteurs de *Wnt1* et/ou de *Pax3*. PAX3, un facteur de transcription, et le protooncogène WNT1, ligand du récepteur Frizzled, sont exprimés par les cellules dérivées de la crête neurale. L'invalidation conditionnelle de *Myocd* (le gène codant pour la myocardine) dans les VSMC dérivées de la crête neurale présente un PDA et il est létal dans les 3 jours suivant la naissance (Huang et al., 2008). Cette létalité postnatale est associée à un déficit de protéines contractiles : SMA, SM-MHC et SM22α. En reflet de cette moindre présence de protéines contractiles, les auteurs

observent une augmentation des dépôts de MEC : Fibronectine et Laminine. Cela suggère une présence accrue de VSMC synthétiques plutôt que contractiles et donc un défaut de contractilité (Huang et al., 2008).

**TFAP2B** est un facteur de transcription spécifique des cellules de la crête Neurale. Des mutations de ce gène sont responsables du syndrome de Char chez l'homme, une pathologie associant PDA, dimorphisme facial et anomalies des mains. Cette pathologie sera développée davantage dans la partie consacrée aux pathologies humaines associées à un PDA. Les souris homozygotes *Tfap2b*<sup>-/-</sup> meurent dans les 24h suivant la naissance pour la grande majorité, et toutes présentent un PDA. Les auteurs n'étudient pas en détail le phénotype des VSMC dans cette invalidation (Zhao et al., 2011). Cependant, l'équipe de Clyman avait analysé en 2008 la même souris et avait trouvé une quantité moins importante de Calponine dans le DA à E18.5, suggérant que l'absence de TFAP2B conduisait à un défaut de maturation des VSMC. Ils suggéraient aussi que la diminution d'expression d'ET-1 chez les *Tfap2b*<sup>-/-</sup> pouvait être responsable d'un problème de différenciation des VSMC (Ivey et al., 2008). Ils s'appuyaient pour cela sur des résultats démontrant que l'ET-1 favorise la différenciation des VSMC (Hahn et al., 1992).

L'étude générale du phénotype de la souris *Tfap2b*<sup>-/-</sup> est surprenante. Elle a été initialement générée par Moser qui a trouvé que sa létalité postnatale était associée à une insuffisance rénale (Moser et al., 2003), sans décrire un phénotype sur le DA. Elle s'est ensuite retrouvée entre les mains du groupe de Clyman, grand spécialiste du DA, qui décrit en 2008 les régulations transcriptionnelles associées à l'invalidation de *Tfap2b* (HIF2A et ET-1). Pour autant il ne parle pas d'un phénotype de PDA. Et ce n'est donc qu'en 2011 que ce phénotype est décrit, à nouveau par le groupe de Moser.

L'invalidation de *Jag1* illustre la nécessité pour les VSMC d'acquérir un phénotype contractile dans l'ensemble de la média. **JAG1** est exprimé dans les CE et les VSMC et est un ligand de la voie NOTCH. Cette voie de signalisation joue des rôles très importants dans l'embryogenèse et le développement cardiaque. La majorité des KO de cette voie sont létaux. En ciblant *Jag1* dans les VSMC grâce à la souris SM22 $\alpha$ -Cre, les auteurs obtiennent une létalité post-natale rapide. Les souris meurent dans les 24 à 48h et 95% présentent un PDA associé à une diminution de l'expression de gènes codant pour des protéines contractiles : SM22, SMA2 $\alpha$ , SMA2g, smoothline, calponine. Mais surtout, ces souris ont un défaut de propagation du signal de différenciation des VSMC contractiles dans la profondeur de la media. JAG1 étant exprimé dans les CE, la première couche de SMC peut se différencier et devenir contractile. Mais les couches profondes du DA en sont incapables (Figure 40) (Feng et al., 2010).

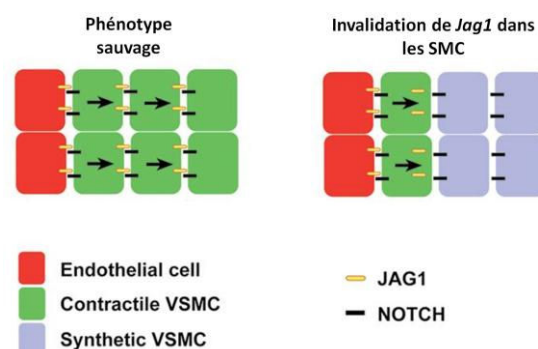


Figure 40 Défaut de différenciation des SMC dans les souris avec une invalidation de *Jag1* dans les SMC. (Feng et al., 2010)

**ILK (Integrin Linked Kinase)** est une kinase localisée aux adhésions focales et permettant de faire le lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine via les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$ . Les souris *Ilk*-KO dans les VSMC (avec la souris SM22 $\alpha$ -Cre) présentent aussi une létalité post-natale associée à un PDA. Ce PDA est concomitant d'une altération du phénotype contractile des VSMC, avec une moindre expression des ARNm de protéines contractiles : SM22 $\alpha$ , SMA, SM-MHC. Au niveau de la MEC, les auteurs notent la présence de fibres élastiques interrompues, associées à une diminution de la quantité de fibronectine, avec toutefois davantage de Fibrilline-1 (Shen et al., 2011).

L'invalidation la plus drastique affectant le phénotype contractile des VSMC pourrait être à première vue celle du gène codant pour la protéine **SMMHC (Myh11)**. Cependant, bien que ces souriceaux meurent dans les 24h suivant leur naissance, leur DA se ferme, mais avec du retard (Morano et al., 2000). Chez l'homme, la mutation de la MYH11 est responsable d'un syndrome associant PDA et TAAD (Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection) (Zhu et al., 2006).

L'invalidation de *Brg1* dans les VSMC est la cause de défauts de contractilité qui se traduisent par un PDA chez 30% des souriceaux (Zhang et al., 2011a). BRG1 est la sous-unité ATPase du complexe BAF (Brg1/Brm-associated factor) qui est le principal complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant chez les vertébrés (Hang et al., 2010).

**Tableau 4 Invalidations touchant les VSMC du DA et leurs conséquences sur la survenue d'un PDA.**

Symbole et nom du gène	Génotype	% PDA	% mortalité néonatale	Référence
<b>Myh11</b> SM-MHC Smooth muscle myosine heavy chain	<i>Myh11</i> <sup>-/-</sup>	6 à 12h de délai	100	(Morano et al., 2000)
<b>Myocd</b> Myocardin inactivée dans les cellules de la crête neurale	<i>Myocd</i> <sup>f/f</sup> <i>Wnt1</i> <sup>Cre+</sup> <i>Pax3</i> <sup>Cre+</sup>	>95	>95	(Huang et al., 2008)
<b>Jag1</b> Jag1 inactivé dans les VSMC	<i>Jag1</i> <sup>f/f</sup> <i>Sm22a</i> <sup>-Cre+</sup> ( <i>Tagln</i> <sup>-Cre+</sup> )	95	100 à P2	(Feng et al., 2010)
<b>Brg1</b> Brahma-Related Gene 1 inactivé dans les VSMC	<i>Brg1</i> <sup>f/f</sup> <i>Myh11</i> <sup>Cre+</sup>	30	40	(Zhang et al., 2011a)
<b>Tfap2b</b> Transcription factor AP-2-beta	<i>Tfap2b</i> <sup>-/-</sup>	100	100	(Zhao et al., 2011) (Ivey et al., 2008) (Moser et al., 2003)
<b>Ilk</b> Integrin-linked protein kinase	<i>ILK</i> <sup>f/f</sup> <i>Sm22a</i> <sup>-Cre+</sup> ( <i>Tagln</i> <sup>-Cre+</sup> )	100	100	(Shen et al., 2011)

### 3. Autres invalidations

En 2010, le groupe de Masseberg a mis en évidence l'implication des plaquettes dans la fermeture du DA. A l'appui de leur démonstration, ils utilisent 2 souris KO : *Itga2b*<sup>-/-</sup> et *Nfe2*<sup>-/-</sup>. **ITGA2B (CD41)** est une intégrine spécifique du lignage plaquettaire impliquée dans l'agrégation plaquettaire et dans l'adhésion au fibrinogène et au facteur de Von Willebrand. **NFE2** est un facteur de transcription régulant la maturation et la différenciation des mégacaryocytes. 30% des souriceaux

*Itga2b*<sup>-/-</sup> présentent un PDA 12h après leur naissance et 70% des souriceaux *Nfe2*<sup>-/-</sup> (Echtler et al., 2010).

Le groupe de Coceani a étudié le KO du récepteur **ETA**, le récepteur de l'endothéline-1. Cette étude s'intègre dans leur modèle de détection de l'O<sub>2</sub> via les cytochromes P450, l'ET-1 et ETA. Les souriceaux se portent bien et leur DA se ferme normalement. Cependant sa contractilité en réponse à l'O<sub>2</sub> est moindre. Ce résultat plaide pour un rôle mineur de la signalisation ET-1/ETA sur la fermeture du DA (Coceani et al., 1999).

**MF1 (FOXC1)** est un facteur de transcription exprimé dans de multiples tissus. Les souriceaux *Mf1*-KO meurent très rapidement à la naissance et présentent un PDA dans 100% des cas. Mais ils sont également incapables de respirer à cause de l'absence de sternum. Les auteurs émettent donc l'hypothèse que le maintien de l'ouverture du DA est lié à ce problème de respiration plutôt qu'à un défaut de maturation des VSMC ou de remodelage de la paroi (Winnier et al., 1999).

L'invalidation totale de **Has2** est létale au cours du développement embryonnaire (E10) du fait de graves défauts cardiaques et vasculaires et d'une absence de transformation de l'épithélium en mésenchyme. Les coussins de l'AVC (qui sont les précurseurs des valves mitrale et tricuspide) ne se forment pas chez les *Has2*<sup>-/-</sup>, chez qui la trabéculatation n'a également pas lieu (Camenisch et al., 2000). Le KO conditionnel de *Has2* sous contrôle du promoteur de *Prx1* a été réalisé, initialement pour étudier le développement squelettique. *Prx1* est en effet un facteur de transcription exprimé dans le mésoderme des membres en développement. Cependant, PRX1 est également exprimé dans le DA et les souriceaux survivent à la période postnatale (Matsumoto et al., 2009). Il serait nécessaire d'étudier plus en détail ce phénotype au niveau du DA, ou d'utiliser d'autres promoteurs, comme celui de *Sm22α* ou de *Tfap2b*, pour réaliser d'autres invalidations conditionnelles de *Has2*.

**Tableau 5 Invalidations variées et leurs conséquences sur la survenue d'un PDA**

Symbole et nom du gène	Génotype	% PDA	% mortalité néonatale	Référence
<b><i>Itga2b</i></b> Integrin alpha-IIb CD41 GPalph IIb	<i>Itga2b</i> <sup>-/-</sup>	30		(Echtler et al., 2010)
<b><i>Nfe2</i></b> Transcription factor NF-E2 45 kDa subunit Nuclear factor, erythroid-derived 2	<i>Nfe2</i> <sup>-/-</sup>	70		
<b><i>Eta</i></b> Endothelin-1 receptor	<i>Eta</i> <sup>-/-</sup>	0	0	(Coceani et al., 1999)
<b><i>Foxc1</i></b> Forkhead box protein C1 (Mesoderm forkhead 1 MF-1)	<i>Foxc1</i> <sup>-/-</sup>	100	100	(Winnier et al., 1999)
<b><i>Has2</i></b> Hyaluronic acid synthase 2	<i>Has2</i> <sup>f/f</sup> <i>Prx1</i> <sup>Cre</sup>	0	0	(Matsumoto et al., 2009)

#### 4. Autres modèles animaux

Les rats de la souche Brown Norway (BN) présentent un taux très élevé de PDA (86%). Les animaux survivent néanmoins jusqu'à l'âge adulte car le shunt n'est pas hémodynamiquement significatif. De fait leur DA est souvent sténosé ou diverticulaire. Finalement, la transformation en ligament n'a pas eu lieu, ce que les auteurs attribuent à une répartition anormale de l'élastine et à ses effets subséquents sur la migration et la prolifération des VSMC (Bokenkamp et al., 2006).

Certaines souches de Beagles présentent des taux relativement élevés de PDA. Certaines équipes se sont servies de ce modèle pour réaliser des études structurales du DA dans les années 1980. Mais ce modèle n'est plus utilisé depuis longtemps.

## VI. Les pathologies humaines associées au PDA.

La base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) recense près de 100 pathologies pour lesquelles un PDA est associé. Ce large nombre suggère que de nombreux facteurs génétiques peuvent être impliqués dans un PDA. Quatre pathologies seront décrites, ce sont les plus pertinentes dans l'étude de la persistance du DA, c'est-à-dire que ce sont ceux dont le PDA n'est associé qu'à des défauts cardiaques mineurs ou ceux dont le taux de PDA est important.

### 1. Syndrome de Char.

Le syndrome de Char est une maladie autosomale dominante dont les caractéristiques sont un PDA, des dimorphismes faciaux et des anomalies des mains. L'équipe de Gelb a identifié le gène dont la mutation est responsable de ce syndrome : c'est celui codant le facteur de transcription TFAP2B, spécifique des cellules de la crête neurale (Satoda et al., 2000). Les mutations observées n'empêchent pas la dimérisation de TFAP2B mais affectent sa liaison sur les séquences cibles. Plus précisément, 2 zones de mutation ont été retrouvées : des mutations dans le domaine de liaison à l'ADN, et des mutations dans le domaine de transactivation. Ce dernier type de mutation engendre un phénotype particulier : un PDA, mais avec de très discrètes anomalies faciales et une absence apparente d'anomalies des mains. Cette association entre le génotype et le phénotype suggère l'existence de coactivateurs de TFAP2B permettant une spécificité d'action au niveau du DA (Zhao et al., 2001). Les souris invalidées pour *Tfap2b* présentent également un PDA (Zhao et al., 2011).

### 2. Syndrome de Loeys-Dietz.

Ce syndrome est causé par des mutations des gènes *TGFBR1* ou *TGFBR2*, des récepteurs de la famille du TGF $\beta$ . Il est caractérisé par des anomalies cardiovasculaires, craniofaciales, neurocognitives et de développement du squelette. Les auteurs décrivent ce nouveau syndrome à partir de la description de 10 familles et montrent que sa transmission est autosomale dominante, avec des tableaux cliniques variés. 54% des individus affectés présentent un PDA et tous sont touchés par des anévrismes de l'aorte. La majorité des mutations sont retrouvées dans le domaine kinase intracellulaire. Les analyses histologiques des aortes de ces patients montrent une diminution du contenu en élastine ainsi qu'une désorganisation des fibres élastiques de la media. D'importants dépôts de collagène sont également observés. Les analyses ultrastructurales montrent une diminution de l'association des VSMC avec les dépôts d'élastine (Loeys et al., 2005).



### 3. Mutations de MYH11

La force contractile des VSMC requiert l'interaction cyclique de la chaîne lourde de la  $\beta$ -myosine (MYH11 ou SMMHC) avec l' $\alpha$ -actine (ACTA2). Des mutations dans ces 2 protéines sont responsables de PDA. C'est ce qu'a tout d'abord montré l'équipe de Xavier Jeunemaitre en identifiant en 2006 des mutations de la *MYH11* comme étant responsables d'un syndrome causant un PDA et des TAAO (Zhu et al., 2006). Cette association PDA / TAAO a été récemment renforcée par la description de nouvelles mutations de la *MYH11* (Harakalova et al., 2013). Ces résultats font écho à l'invalidation de *Myh11* qui cause un retard de fermeture du DA chez la souris (Morano et al., 2000).

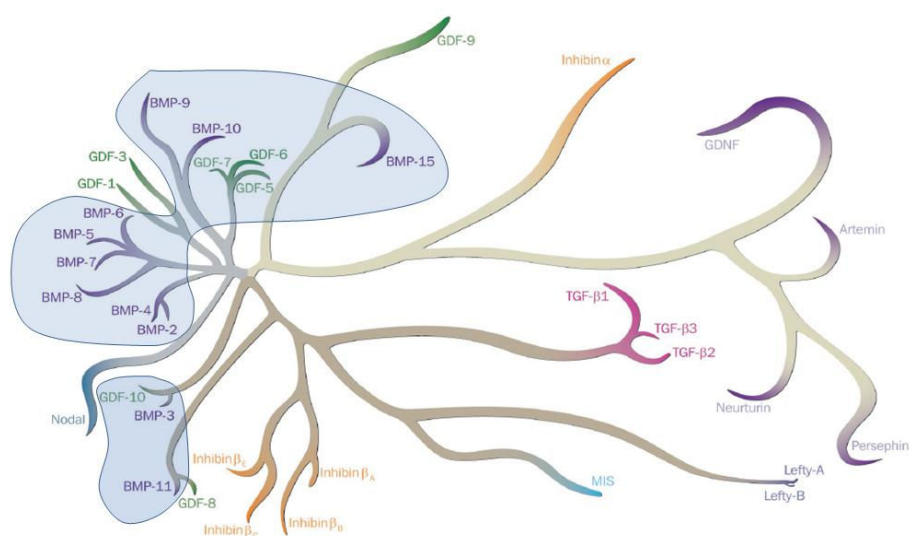
### 4. Mutations de ACTA2

Guo et al. ont ensuite découvert en 2007 que des mutations de *ACTA2* étaient également responsables, entre autre, de TAAO et de PDA. Parmi les mutations décrites, seules celles de l'arginine 258 sont associées à un PDA (Guo et al., 2007). Cette mutation déstabiliserait la conformation de l'actine et empêcherait une régulation correcte de sa polymérisation (Malloy et al., 2012).

## Partie 4

# LA FAMILLE DES BMP

Les ligands et leurs récepteurs forment souvent des superfamilles dont le nombre de membres augmente avec la complexité de l'organisme. La nature semble en effet préférer recycler ses modèles à succès et développer de nouvelles fonctionnalités en dupliquant des gènes, plutôt que d'inventer de nouvelles structures pour chaque fonction (Carroll, 2001). La super famille TGF $\beta$  en est la parfaite illustration.



**Figure 41 Arbre phylogénétique de la famille TGF $\beta$ .**

La longueur des branches représente le nombre d'acides aminés différents dans le domaine mature. Les membres de sous famille BMP ont été surlignés en bleu. Schéma adapté de:  
<http://www.rndsystems.com/Resources/images/16252.png>

La famille des BMP appartient à la super famille TGF $\beta$  qui comporte à ce jour plus de 30 membres chez l'homme (Figure 41). Les membres de cette famille peuvent être regroupés : les isoformes du TGF- $\beta$ , les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), les GDFs (Growth and Differentiation Factors), les activines et les inhibines, l'AMH, Nodal, Myostatin et la famille du GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor). Certaines protéines portent plusieurs noms, c'est le cas par exemple des BMP12, 13 et 14 qui sont également nommées, GDF 7, 6 et 5. Dans la suite de cette introduction, je me limiterai au maximum aux groupes des BMP (Tableau 6).

	Dénomination BMP	Autre dénomination
Groupe BMP2/4	BMP2	-
	BMP4	-
Groupe OP-1	BMP5	-
	BMP6	VGR-1
	BMP7	OP-1
	BMP8A	-
	BMP8B	OP-2
Groupe BMP9	BMP9	GDF2
	BMP10	-
Groupe GDF5	BMP12	GDF7
	BMP13	GDF6
	BMP14	GDF5
Autres groupes	BMP3A	-
	BMP3B	GDF10
	BMP11	GDF11
	BMP15	GDF9B

**Tableau 6 La famille des BMPs**

En fonction de la proximité de leur séquence, les BMP peuvent être regroupées en 5 groupes. Dans la suite de cet exposé, la dénomination BMP sera utilisée. BMP1, initialement décrite comme une BMP n'en est en fait pas une. C'est une protéase. OP: Osteogenic Protein, VGR: VG-1-related protein.

## I. Les ligands

### 1. Maturation et structure

Les membres de la super famille TGF $\beta$  comportent tous 4 domaines : (1) un peptide signal responsable de la sécrétion de la protéine, (2) un prodomaine, (3) un site de clivage par des protéases et (4) un domaine mature (Figure 42).

Les BMP sont dans un premier temps traduites sous la forme d'une pré-pro-BMP de 400 à 500 acides aminés. Ces précurseurs sont ensuite dimérisés et éventuellement glycosylés au cours de leur transit dans l'appareil de Golgi. Dans un second temps, cette forme non mature est clivée par protéolyse au niveau du motif Arg-X-X-Arg par une sérine endoprotéase, dans le compartiment de Golgi ou dans l'espace extracellulaire (Figure 42) (Harrison et al., 2011).

A la suite de ce clivage, et pour la plupart des BMP, le prodomaine reste associé de manière non covalente à la forme mature dimérique. Les sérines endoprotéases qui clivent les dimères immatures sont appelées pro-Protéines convertases (PC) et quatre d'entre elles sont responsables de la majorité des processus de clivages : ce sont la furine, PACE, PC5/6 et PC7 (Susan-Resiga et al., 2011) (Seidah et al., 2008).

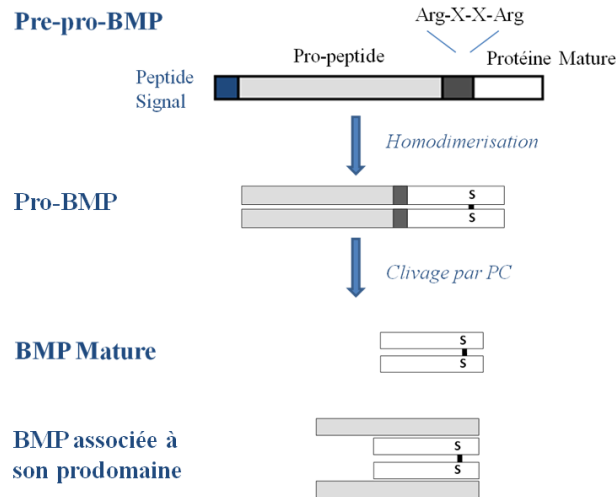


Figure 42 La maturation des BMPs

Toutes les formes matures des membres de la famille TGF $\beta$  sont organisées autour d'un nœud cystéique. Chaque monomère contient 7 cystéines, 6 étant impliquées dans des ponts disulfures intra-chaîne formant le nœud cystéique, et la 7<sup>ème</sup> étant engagée dans la liaison covalente avec le second monomère (Figure 43) (David et al., 2009) (Vitt et al., 2001). Bien que la majorité des BMP circule sous forme d'homodimères, des hétérodimères ont été décrits, impliquant BMP2,4,5,6 et 7, et montrant tous une activité plus importante que les homodimères (Israel et al., 1996).

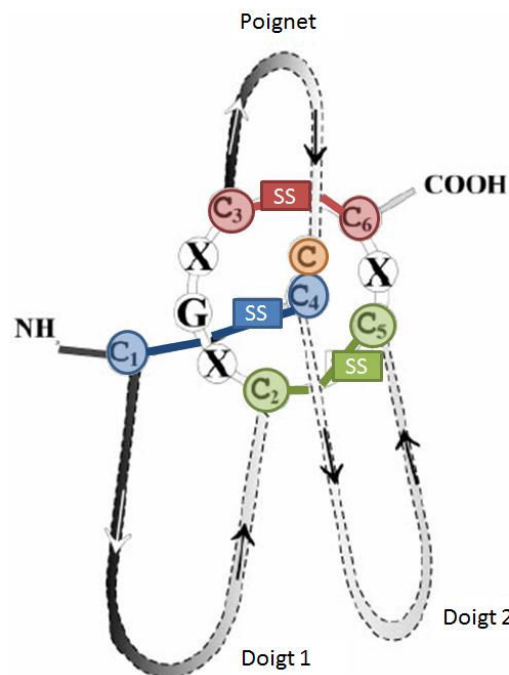


Figure 43 Schéma d'un nœud cystéique.

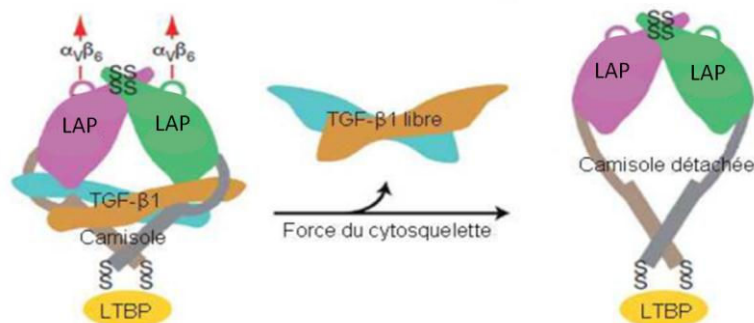
Les 3 ponts disulfures, représentés en bleu vert et rouge, permettent de typiquement replier la protéine en deux « doigts » caractéristiques et en un « poignet ». La structure tridimensionnelle est pour cette raison appelée « main ». La 7<sup>ème</sup> cystéine, en orange, est engagée dans la formation du dimère. La famille TGF $\beta$  se distingue des autres protéines à nœud cystéique par la présence du codon stop juste après la 6<sup>ème</sup> cystéine.

Schéma adapté de (Vitt et al., 2001)

## 2. Formes circulantes

La plupart des formes matures des BMP restent associées de manière non covalente à leur prodomaine. Ces complexes peuvent être inactifs, comme pour le TGF- $\beta$ , GDF8 (la myostatine), GDF11 et BMP10 (Sengle et al., 2011). Par contre BMP5 (Sengle et al., 2011) et BMP9 (Brown et al., 2005) sont actifs associés à leur prodomaine. Par ailleurs, le prodomaine des BMP présente une affinité importante pour des protéines de la MEC, comme la fibriline, ce qui peut constituer un site de stockage ou un réservoir pour les BMP (Sengle et al., 2008). Le prodomaine est également impliqué dans la stabilité des BMP et donc dans leur demi-vie (Constam and Robertson, 1999).

L'activation des formes latentes peut se produire par différents mécanismes. L'exemple le plus documenté est celui du TGF- $\beta$ . In vitro, il est possible de dissocier le dimère mature TGF- $\beta$  des prodomaines, entre autre par chauffage et par variation de pH. In vivo, l'acidification (pH<3) de l'espace extracellulaire des ostéoclastes peut expliquer l'activation du TGF- $\beta$  lors de la résorption osseuse (Oreffo et al., 1989). Des processus enzymatiques peuvent aussi activer TGF- $\beta$ . Les glycosidases (endoglycosidase-F, sialidase, neuraminidase, N-glycanase) activent TGF- $\beta$ . Le virus de la grippe activerait TGF- $\beta$  en utilisant une neuraminidase (Schultz-Cherry and Hinshaw, 1996). La dégradation protéolytique des prodomaines permet aussi l'activation du TGF- $\beta$ . Les protéases à sérine (plasmine, cathepsine D) clivent le domaine N-terminal des prodomaines, activant ainsi TGF- $\beta$ . L'interaction du prodomaine du TGF- $\beta$  avec la thrombospondine-1 ou 2, protéine fortement présente dans les plaquettes, active TGF- $\beta$  (Schultz-Cherry et al., 1994). Le fait d'exercer une traction entre les prodomaines et une protéine qui leur est liée (LTBP : Latent TGF $\beta$  Binding Protein) permet de libérer le TGF- $\beta$  qui peut alors aller se lier à ses récepteurs (Figure 44) (Shi et al., 2011). Les BMP sont essentiellement décrites pour être activées par des protéases.



**Figure 44 Activation du TGF- $\beta$ 1 par traction physique.**

Le dimère du TGF- $\beta$ 1 (bleu/marron) est inactif associé à son prodomaine (LAP, Latent Associated Protein, violet/vert) qui le séquestre telle une camisole. La liaison du LAP, d'un côté sur une LTBP (Latent TGF- $\beta$  Binding Protein) et de l'autre sur le cytosquelette via des intégrines ( $\alpha$ v $\beta$ 5) permet la libération du TGF- $\beta$ 1 au moment où le cytosquelette se contracte (Flèches rouges: sens de traction). Schéma adapté de (Shi et al., 2011)

## II. Voies de signalisation

Dans la famille TGF $\beta$ , la transmission du signal s'effectue via un complexe hétérotétramérique de récepteurs transmembranaires de type I et de type II à activité sérine/thréonine kinase. Sept récepteurs de type I et cinq récepteurs de type II ont été identifiés (Tableau 7). Différentes combinaisons de récepteurs se lient à la trentaine de ligands de la famille TGF $\beta$  permettant d'augmenter la diversité de la cascade de signalisation (Feng and Derynck, 2005). La cascade de signalisation canonique met en jeu les facteurs de transcription Smads, mais une signalisation Smad indépendante existe également.

Dénomination ALK	Autre dénomination	Commentaires	Dénomination classique	Autre dénomination
ALK1	ACVRL1	Groupe ALK1 Signalisation via Smad 1, 5, et 8	ACTR2A	ACVR2
ALK2	ACVR1		ACTR2B	ACVR2B
ALK3	BMPR1A	Groupe BMP Signalisation via Smad 1, 5, et 8	BMPR2	-
ALK6	BMPR1B		TGFBR2	-
ALK4	ACVR1B	Groupe TGF- $\beta$ Signalisation via Smad 2 et 3	AMHR2	MIS2
ALK5	TGFBR1			
ALK7	ACVR1C			

**Tableau 7 Les récepteurs de la famille TGF $\beta$ .**

Les récepteurs de type I forment 3 sous-familles suivant leur homologie de séquence et les Smads recrutés lors de la transduction du signal. Cet aspect sera détaillé plus loin. Dans la suite de cet exposé, seule la dénomination ALK sera utilisée. Les récepteurs de type II forment 2 sous familles suivant leur homologie de séquence.

## 1. Les récepteurs

Il existe deux sous-familles de récepteurs BMP de type I, définies par leur homologie de séquence, ALK1/ALK2 et ALK3/ALK6. Trois récepteurs de type II sont impliqués dans la voie de signalisation BMP : BMPR2, ACTR2A et ACTR2B. Seul le récepteur de type II, BMPR2, est spécifique des BMPs. Les récepteurs de type I et II sont composés d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique à activité sérine/thréonine kinase. Ce sont des glycoprotéines de 50-60 kDa et 70-80 kDa respectivement, et dont le domaine N-terminal extracellulaire est glycosylé.

La transduction du signal est initiée par la liaison des ligands BMPs aux récepteurs. Cette liaison est dépendante de l'affinité des BMPs pour leur récepteur de type I et II. En effet, le ligand interagit d'abord avec le récepteur de plus forte affinité. Par exemple, BMP2 et BMP4 se fixent d'abord au récepteur de type I (ALK3 et ALK6) avant de se fixer au récepteur de type II. A l'inverse, le groupe OP-1 recrute d'abord son récepteur de type II (Feng and Derynck, 2005).

La liaison du ligand induit la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II, dans le domaine GS du récepteur de type I. La boîte GS est un domaine riche en sérine et glycine (séquence SGSGSG) situé entre la partie juxta-membranaire et le domaine kinase qui permet de réguler l'activité des récepteurs de type I (Massague, 1998). Cette transphosphorylation entraîne l'activation du récepteur de type I, et, dans le cas de la signalisation canonique, le recrutement des Smads. Les multiples combinaisons possibles entre les ligands et les récepteurs participent à la diversité de la voie de signalisation et, *in fine*, à la spécificité de la réponse (Tableau 8).

	Récepteurs	Ligands
Type 1	ALK1	BMP9/10
	ALK2	BMP6/7/9
	ALK3	BMP2/4/5/6/7/10/13/14
	ALK6	BMP2/4/6/7/10/13/14/15
Type 2	BMPR2	BMP2/4/6/7/9/10/13/14/15
	ACTR2A	BMP2/4/5/6/7/9/10
	ACTR2B	BMP2/4/6/9/10

**Tableau 8 Les interactions démontrées entre les BMPs et leurs récepteurs.**  
D'après (Lowery and de Caestecker, 2010)

## 2. Signalisation SMAD dépendante

La voie de signalisation canonique de la famille TGF- $\beta$  fait intervenir les protéines SMAD (Figure 45). Il existe huit protéines SMAD identifiées chez l'homme, qui sont réparties en trois sous-groupes en fonction de leur rôle dans la transduction du signal : les R-SMAD (receptor-Smad), SMAD4 et les I-SMAD (Inhibitor-Smad). Les SMAD sont constitués d'un domaine MH1 (Mad Homology domain 1 ; domaine de liaison à l'ADN) et un domaine MH2 (interaction avec les autres SMAD et facteurs de transcription), séparés par une région flexible, moins conservée, le linker. Les I-SMAD sont dépourvues du domaine MH1 (Massague, 1998).

Les **R-SMAD** (Smad1, 2, 3, 5 et 8) interagissent et sont phosphorylés par les récepteurs de type I. Cette phosphorylation a lieu sur un motif SSxS situé dans la partie C-terminale et elle induit un changement de conformation (Souchevnytskyi et al., 1997). Les récepteurs ALK4, ALK5 et ALK7 activent les SMAD 2 et 3 (signalisation TGF $\beta$ ) alors que les SMAD 1, 5 et 8 sont activées par les récepteurs ALK1, ALK2, ALK3, ALK6 (signalisation BMP). Toutefois, des études montrent une activation SMAD1/5/8 induite par TGF $\beta$  via le complexe TGF $\beta$ RII/ALK5. De même BMP2 et BMP9 peuvent induire la phosphorylation des SMAD 1/5/8 mais aussi de SMAD2 (Upton et al., 2009).

**SMAD4** s'associe ensuite avec les R-SMAD activées par phosphorylation pour former un complexe hétérotrimérique (2 R-SMAD + SMAD4). Ce complexe est ensuite transloqué dans le noyau, où il active une réponse transcriptionnelle en se liant à des Smad-Binding Element (SBE) avec l'aide de co-facteurs de transcription (Miyazono et al., 2005). SMAD4 est un médiateur commun des voies de signalisation BMP et TGF $\beta$ .

Les **I-SMAD** (Smad6 et Smad7) sont des inhibiteurs de la voie SMAD. L'inhibition peut venir de la dégradation des récepteurs et de SMAD4 par le protéasome. Dans ce cas, les I-SMAD recrutent des E3-ubiquitine-ligases nommées SMURF1 et SMURF2 (Moren et al., 2005). L'inhibition peut également provenir d'une compétition des I-SMAD avec les R-SMAD pour la liaison avec les récepteurs ou avec SMAD4. SMAD1 peut par exemple former un complexe inactif avec SMAD6 au lieu de se lier à SMAD4 (Massague et al., 2005). SMAD 6 et 7 possèdent aussi des fonctions nucléaires et peuvent agir comme des co-facteurs de transcription (Miyake et al., 2010) (Berghorn et al., 2006). Par ailleurs, il existe un variant d'épissage de SMAD8, nommé SMAD8B, ne possédant pas le motif SSxS. Il est donc un inhibiteur de la voie BMP (Nishita et al., 1999).



La signalisation canonique SMAD-dépendante possède des niveaux de complexité supérieurs. L'équipe de Massagué a montré que SMAD4 entre en compétition avec TIF1 $\gamma$  pour la liaison de SMAD2 et 3. En fonction de l'association qui s'effectue, les réponses cellulaires seront différentes : en réponse au TGF- $\beta$ , le complexe TIF1 $\gamma$ /Smad2/3 stimule la différenciation érythrocytaire, alors que le complexe Smad4/Smad2/3 entraîne une inhibition de la prolifération des cellules érythroïdes (He et al., 2006).

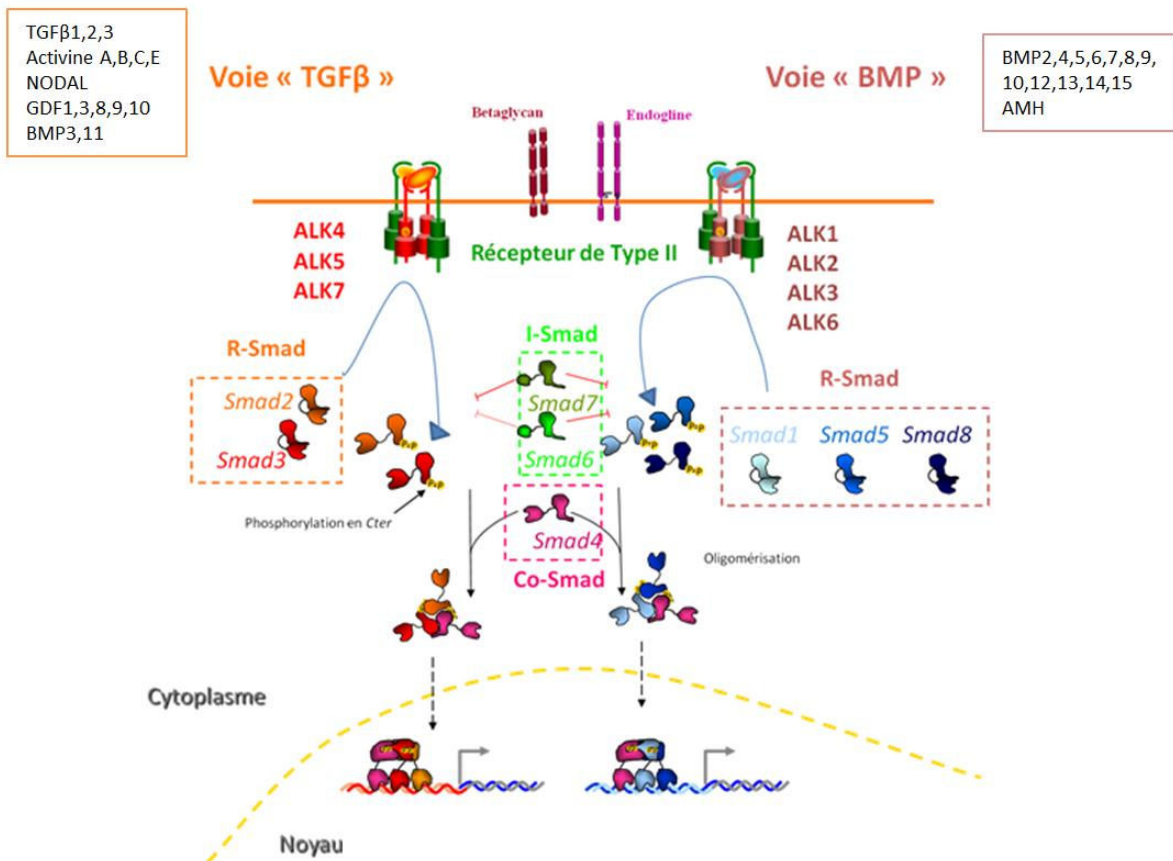
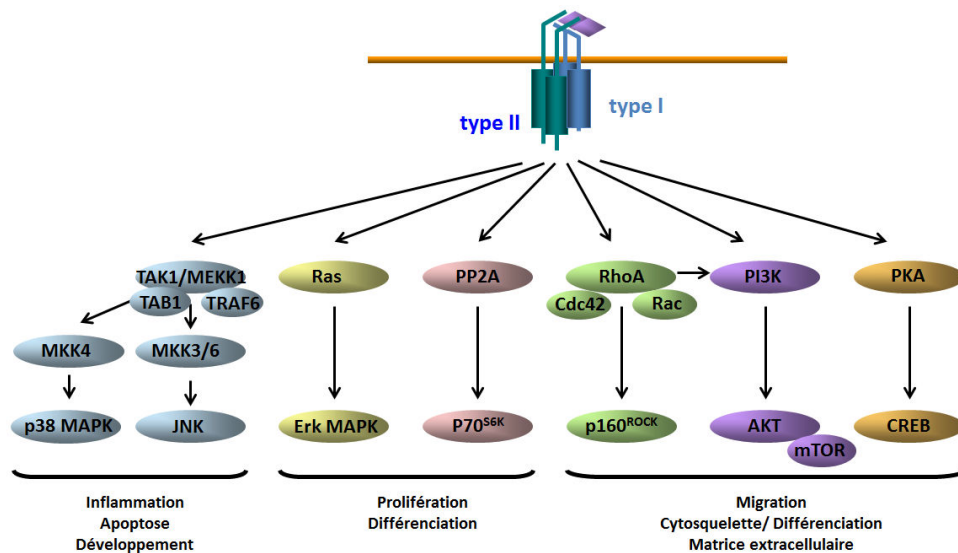


Figure 45 Voie de signalisation canonique de la famille TGF $\beta$  : la voie SMAD

### 3. Signalisation SMAD indépendante

La signalisation SMAD indépendante correspond à la signalisation non canonique de la famille TGF $\beta$  (Figure 46). Ces voies non canoniques incluent entre autres la voie des MAPK, les petites protéines G et la voie PI3K/Akt.



**Figure 46 La signalisation SMAD-indépendante.**

De nombreuses voies de signalisation peuvent être activées indépendamment de la signalisation canonique SMAD. Les mécanismes permettant de privilégier l'une ou l'autre de ces voies ne sont pas complètement élucidés. D'après (Derynck and Zhang, 2003)

La voie des MAPKs est composée de trois sous-familles: ERK (Extracellular-signal-Regulated Kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinases) et p38, et elle correspond à une cascade de trois protéines kinases. ALK5 est capable d'activer indirectement Ras et la voie ERK par l'intermédiaire du complexe ShcA/Grb2/Sos (Lee et al., 2007). TGF $\beta$  peut aussi activer les voies JNK et p38 via TAK1 et TRAF6. TRAF6 est une E3-ubiquitine-ligase qui active la MAP3K TAK1. TAK1 phosphoryle ensuite MKK4 et MKK3/6, activateurs respectifs de JNK et p38. Les récepteurs de la famille BMP peuvent activer directement les MAPKs par l'intermédiaire de TAK1 et TAB1. TAK1 et TAB1 régulent l'activation de p38 et de JNK en s'associant à ALK3 via une protéine adaptatrice XIAP (Zhang, 2009).

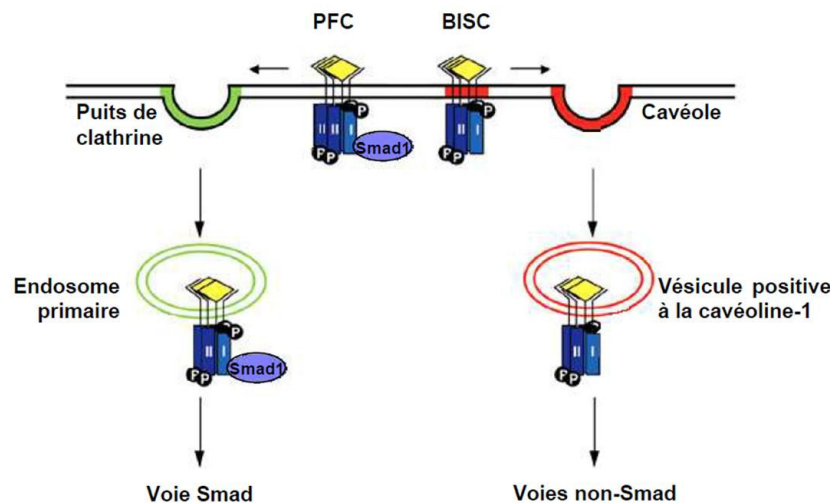
Le TGF $\beta$  peut activer les petites protéines G comme RhoA, Rac et Cdc42 qui jouent un rôle dans le contrôle dynamique du cytosquelette et la mobilité cellulaire. En ce qui concerne la voie BMP, Cdc42 est nécessaire à l'activation de LIM kinase-1 (LIMK-1). LIMK-1 est un acteur clef de la dynamique de l'actine qui interagit directement avec BMPR-II (Zhang, 2009).

La PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-phosphate Kinase) est capable de phosphoryler le PIP2 (Phosphatidyl Inositol biPhosphate) en PIP3. PDK-1 (Phosphoinositide Dependent Kinase-1), qui lie PIP3, peut alors phosphoryler AKT (qui lie aussi PIP3), qui devient active. TGF- $\beta$  induit une rapide phosphorylation d'AKT, indépendante de SMAD2/3 et TGF $\beta$ R2 lie p85, l'unité régulatrice de PI3K, qui est activée lors de la stimulation de TGF- $\beta$ . Enfin, la voie mTor (Mammalian Target Of Rapamycin), qui est activée par AKT, est impliquée dans l'EMT induite par TGF- $\beta$  (Zhang, 2009). La voie BMP est également capable d'activer la signalisation PI3K/AKT (Sui et al., 2009) (Gamell et al., 2008).

Le TGF- $\beta$  signale également par la PP2A (Protein Phosphatase 2A). La PP2A interagit avec la kinase P70<sup>S6K</sup> qui joue un rôle clef dans le cycle cellulaire et dans le contrôle de la traduction (Derynck 2003). La PKA (Protein Kinase A) peut également être mise en jeu dans la transduction du signal, mais d'une manière cAMP indépendante. Cette activation de la PKA est nécessaire à l'activation de CREB

(cAMP Responsive Element Binding Protein) par le TGF- $\beta$  et à l'inhibition de la croissance cellulaire (Zhang, 2009).

Les mécanismes qui déterminent l'activation des voies de signalisation SMAD-dépendantes versus SMAD-indépendante ne sont pas élucidés. Une hypothèse développée est que le choix de la transduction du signal dépend du mode d'endocytose du complexe de récepteur. L'endocytose des récepteurs se fait selon 2 modes : l'endocytose par les puits de clathrine (une protéine cytoplasmique nécessaire à la formation des endosomes primaires) et l'endocytose par les cavéoles, au niveau des radeaux lipidiques. Les travaux de Petra Knaus montrent que la voie SMAD est activée lorsque les récepteurs sont internalisés dans des puits de clathrine, tandis que les voies SMAD-indépendantes sont privilégiées lors de l'internalisation au niveau des radeaux lipidiques (Sieber et al., 2009).



**Figure 47 Déterminisme des voies de signalisation par le mode d'endocytose.**

Suivant que les complexes de récepteurs soient préformés (PFC: Pre-Formed Complexes) ou qu'ils se forment au moment de l'arrivée du ligand (BISC: BMP-Induced Signaling Complexes) les voies d'endocytose et de signalisation seront différentes. Les PFC sont internalisés via des puits de clathrine et déclenchent l'activation de la voie canonique SMAD. Les BISC subissent une endocytose par les cavéoles et activent les voies SMAD indépendantes. Schéma adapté de (Di Guglielmo et al., 2003).

## 4. Modulation des voies de signalisation

### *Les corécepteurs des BMP*

Un certain nombre de corécepteurs intervenant dans la signalisation BMP ont été identifiés. Ils possèdent souvent un grand domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire dépourvu d'activité kinase. Les corécepteurs ne sont pas forcément stimulateurs de la signalisation BMP, ils peuvent également l'inhiber. Parmi les corécepteurs, le Betaglycan et l'Endogline jouent un rôle important dans le développement vasculaire.

Corécepteur	Nom alternatif	Partenaires	Effets sur la signalisation BMP
Endogline	CD105	BMP2/7/9/10	Activateur
Betaglycan	TGFB3	BMP2/4/5/14	Activateur ou Inhibiteur
RGMa	-	BMP2/4/12	Activateur
DRAGON	RGMb	BMP2/4/12	Activateur
Hémojuveline	RGMc	BMP2/4/6/12	Activateur
Bambi	Nma	ALK1/3/6 ACTR2A	Inhibiteur
TRKC	-	BMPR2	Inhibiteur
ROR2	-	ALK6	Activateur ou Inhibiteur

**Tableau 9 Les corécepteurs des BMP et leurs partenaires.**

Les corécepteurs, ou récepteurs de type3 de la signalisation BMP sont décrit pour interagir soit avec les BMP, soit avec leurs récepteurs. D'après (Lowery and de Caestecker, 2010) (Halbrooks et al., 2007) (Babitt et al., 2006) (Onichtchouk et al., 1999) (Jin et al., 2007) (Sammar et al., 2004).

**Le Betaglycan** possède une expression ubiquitaire et il augmente la signalisation des BMP2/4/5/14 en en favorisant leur liaison à ALK3 et ALK6, mais aussi en régulant le trafic et la localisation cellulaire des récepteurs. Cependant, le betaglycan peut aussi jouer un rôle inhibiteur en séquestrant les récepteurs BMPR2 et ACTR2A (Lowery and de Caestecker, 2010).

**L'Endogline**, contrairement au Betaglycan, est principalement exprimée par les cellules endothéliales. A l'exception de BMP9, l'interaction BMP/Endogline est dépendante de la présence de leurs récepteurs BMP respectifs. L'Endogline augmente la signalisation Smad 1/5 induite par BMP7 ou BMP9 (David et al., 2007a) (Schermer et al., 2007).

Parmi les corécepteurs des BMPs, on trouve également la famille des Repulsive Guidance Molecules (RGM). Cette famille est composée de 3 glycoprotéines : RGMa, DRAGON et l'hémojuveline. L'ensemble des RGM est ancré à la membrane par un domaine GPI (Glycosylphosphatidylinositol). Elles sont capables de lier de manière spécifique les BMPs avec une forte affinité. Les protéines RGM facilitent l'interaction de BMP2 et BMP4 avec leur récepteur de type II et permettent d'augmenter la sensibilité des cellules à de faibles concentrations endogènes de BMP (Corradini et al., 2009). L'hémojuveline est notamment le corécepteur de BMP6 dans le contrôle de l'homéostasie du fer. Ces 2 protéines sont nécessaires à la synthèse de l'hepcidine, l'hormone peptidique permettant de faire diminuer les taux de fer sérique (Zhao et al., 2013).

BAMBI s'associe avec les récepteurs de type 1 de la famille TGFβ et inhibe la signalisation TGFβ et BMP (Onichtchouk et al., 1999). Le Corécepteur TrkC est un inhibiteur spécifique des BMP, du fait de son association avec le récepteur de type 2 BMPR2. ROR2, un récepteur tyrosine kinase se liant à ALK6 inhibe la signalisation SMAD dépendante de la voie BMP tout en favorisant les voies SMAD indépendantes (Sammar et al., 2004).

### **Les régulateurs de l'activité des BMPs**

Les ligands de la famille BMP interagissent avec des protéines qui vont avoir une action antagoniste ou activatrice sur la signalisation.

On retrouve parmi les antagonistes des BMPs la Noggin, le TSG (Twisted gastrulation), la Follistatine, BMPER (BMP binding Endothelial cell Precursor-derived Regulator), les membres de la famille Chordin et DAN. Ces protéines de taille variable, monomériques ou dimériques, présentent toutes un nœud cystéique. Elles inhibent la voie de signalisation BMP en séquestrant le ligand. L'affinité de ces antagonistes pour les BMPs est variable. Par exemple, la Noggin lie avec une forte affinité BMP2, BMP4, BMP7, GDF5 mais n'inhibe pas l'activité de BMP9 et BMP10 (Seemann et al., 2009). La Chordin n'exerce son activité inhibitrice que sur BMP2, BMP4 et BMP7. Les effets de ces antagonistes sont contexte- et concentration-dépendants. Par exemple, le TSG forme un complexe trimérique avec la Chordin et la BMP4 qui permet d'inhiber l'activité de la BMP en stabilisant le complexe dans l'os. Mais, le TSG peut également avoir un effet activateur de la voie BMP en favorisant le clivage du complexe BMP/Chordin via la protéase Tolloïde, dans le thymus. De la même façon, BMPER inhibe BMP4 à des fortes concentrations mais active la voie BMP à de faibles concentrations en facilitant l'interaction ligand/récepteur (Umulis et al., 2009).

### *Les récepteurs solubles*

Certains récepteurs de la famille TGF $\beta$  existent sous une forme soluble en plus de leur forme transmembranaire canonique. Comme pour de nombreux autres récepteurs et molécules d'adhésion, leur domaine extracellulaire peut être libéré dans le milieu. Il peut alors fonctionner comme un piège qui séquestre le ligand ou comme un transporteur qui permet au ligand de signaler sur des types cellulaires ne possédant pas le récepteur sous sa forme transmembranaire.

Deux mécanismes sont décrits pour conduire à la libération des formes solubles des récepteurs : L'épissage alternatif et le clivage protéolytique du domaine extracellulaire.

Les récepteurs solubles peuvent être produits à partir d'un variant d'épissage dans lequel l'exon du domaine transmembranaire est absent. Des épissages alternatifs ont notamment été décrits pour des récepteurs ALK5 et ALK7. Les effets de sALK7 n'ont pas été décrits, et sALK5 est capable de se lier à TGF- $\beta$ 1 et TGFBR2 et de signaler (Choi, 1999) (Roberts et al., 2003).

Le clivage protéolytique conduisant à la libération du domaine extracellulaire dans le milieu est le mécanisme qui est le plus commun. Les enzymes responsables de ce clivage sont nommées « sheddases » et il en existe 2 grandes classes : les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) et les MMP (Matrix MetalloProtéases (Hayashida et al., 2010). Ces enzymes sont caractérisées par la présence d'un ion Zn<sup>2+</sup> dans leur site catalytique, et elles sont inhibées par un inhibiteur à large spectre nommé GM6001. Le clivage protéolytique est décrit des récepteur de type 1 et des corécepteur. Des stratégies thérapeutiques reposant sur l'utilisation de formes solubles des récepteurs sont actuellement développées. Elles seront développées dans la partie résultats.

#### *Récepteurs de type 1 :*

ADAM17, une des sheddases les plus étudiées, est capable de cliver ALK5, le récepteur de Type I du TGF $\beta$ . Ce clivage entraîne une diminution de la présentation de ALK5 à la membrane et en conséquence une diminution de la signalisation TGF- $\beta$  et de ses effets anti-prolifératifs. Au sein des récepteurs de la famille TGF $\beta$ , les effets d'ADAM17 semblent être spécifiques puisque ADAM17 est incapable de cliver ALK1,2,3,4 et 6 et le récepteur de type 2 TGFBR2 (Liu et al., 2009). Le clivage par

ADAM17 peut également conduire la libération du domaine intracellulaire de ALK5 qui est transloqué dans le noyau, et agit ensuite comme un régulateur transcriptionnel (Mu et al., 2011).

Des formes solubles de ALK3, ALK6 et BMPR2 ont également été détectées dans des milieux conditionnés de cultures primaires d'ostéoblastes stimulés avec du PMA (Phorbol Myristate Acetate) ou avec la cytokine proinflammatoire IL-1 $\beta$ . Le PMA est un activateur de la protéine kinase C (PKC) et de la signalisation Erk MAP kinases connu pour activer les « sheddases », et notamment ADAM17. En l'absence de transcripts alternatifs, les auteurs concluent que les formes solubles observées proviennent d'un clivage protéolytique (Singhatanadgit et al., 2006).

#### *Corécepteurs :*

Les corécepteurs de la famille TGF $\beta$  peuvent aussi être clivés et circuler dans le sérum, comme c'est le cas pour l'endogline et le betaglycan. Les taux sériques d'endogline soluble (sENG) corrélaient avec la sévérité de la pré-éclampsie, un syndrome d'hypertension artérielle spécifique de la gestation dont la prévalence est estimée entre 3 et 5% des grossesses. Ce syndrome est une cause majeure de morbidité et de mortalité maternelle et fœtale. sENG inhibe la liaison du TGF $\beta$  sur T $\beta$ RII et inhibe la formation de capillaires in vitro (Venkatesha et al., 2006). La protéase responsable du shedding de l'endogline est MMP14 (appelée aussi MT1-MMP) (Hawinkels et al., 2010).

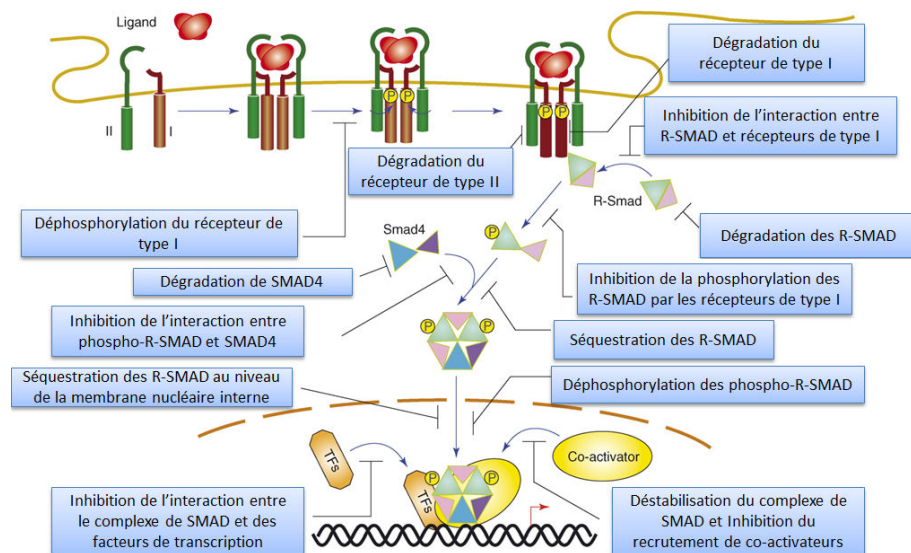
A l'instar de l'endogline, les formes solubles et membranaires du betaglycan exercent des effets opposés, le betaglycan soluble (sBG) étant un inhibiteur des actions du TGF $\beta$ . Le sBG est lui aussi généré par clivage protéolytique et la protéase impliquée est MMP14 (Velasco-Loyden et al., 2004).

Le domaine extracellulaire de l'hémojuvéline est aussi clivé, soit par des pro-protéines convertases de type furine, soit par la matriptase-2. Les sites de clivages sont alors différents et la forme libérée inhibe la signalisation dans le premier cas, ce qu'elle est incapable de faire dans le second (Maxson et al., 2010).

#### *Modulations intra-cellulaires*

Un aspect important de la signalisation est la durée et la force du signal, qui sont liées à son déclenchement et à son arrêt. Le déclenchement du signal a déjà été traité dans les paragraphes précédents, il correspond à la liaison du ligand à son récepteur et à toutes les modulations qui peuvent affecter cette liaison. Les paragraphes qui suivent présenteront les différents processus conduisant à l'extinction intracellulaire du signal (Figure 48).





**Figure 48 Les régulations négatives de la signalisation SMAD.**  
D'après (Itoh and ten Dijke, 2007).

Des phosphatases peuvent intervenir au niveau des récepteurs. C'est par exemple le cas de la protéine Dullard, une sérine-thréonine phosphatase qui régule négativement la voie BMP en déphosphorylant les récepteurs, mais également en favorisant leur dégradation par le protéasome (Satow et al., 2006).

Les I-SMAD, qui sont induits en réponse à l'activation des voies SMAD, ont des effets inhibiteurs de différents ordres. Ils entrent en compétition avec les R-SMAD pour la liaison aux récepteurs de type I activés et pour la liaison à SMAD4. Ils recrutent SMURF1 et SMURF2, des E3-ubiquitine ligases qui vont induire la dégradation des récepteurs de type I (Itoh and ten Dijke, 2007). SMURF1 et SMURF2, mais aussi d'autres ubiquitine ligases, sont par ailleurs impliqués dans la dégradation des R-SMAD et de SMAD4.

D'autres modifications post-traductionnelles régulent également la signalisation de la famille TGF $\beta$ . SMAD7 peut par exemple être acétylé ou poly-ubiquitiné sur les 2 mêmes résidus lysine, l'acétylation empêchant l'ubiquitination et donc la dégradation de SMAD7 (ten Dijke and Hill, 2004). Il faut également, dans cette balance finement équilibrée, tenir compte de l'activité des dé-ubiquitinasés et des desacétylases. La sumoylation, un autre type de modification post-traductionnelle, intervient également dans la régulation de la signalisation. A titre d'exemple, la sumoylation d'ALK5 augmente le recrutement et la phosphorylation de SMAD3 (Lonn et al., 2009).

L'affinité intrinsèque des SMAD pour l'ADN est relativement faible. L'activité transcriptionnelle des SMAD requiert donc la présence de facteurs de transcription ou de co-activateurs transcriptionnels. Le recrutement de co-répresseurs transcriptionnels des SMAD, tels c-Ski, SnoN et TGIF, constitue un moyen d'inhibition de la voie SMAD. *SnoN* est par ailleurs une cible directe du TGF $\beta$  (Itoh and ten Dijke, 2007).

La terminaison de la signalisation SMAD s'effectue également au niveau nucléaire par des phosphatases. Les phosphatases PDP1, PDP2 et PPM1A sont par exemple impliquées dans la



déphosphorylation du domaine C-terminal des SMAD et plus particulièrement dans la terminaison de la signalisation BMP (Itoh and ten Dijke, 2007).

### III. Fonctions

La famille BMP possède des fonctions pléiotropiques. J'illustrerai quelques-unes de ces fonctions mais je me concentrerai surtout sur les effets des BMP sur le système cardio vasculaire.

#### 1. Les fonctions majeures

De manière très précoce, les BMP sont impliqués dans la gastrulation et le développement des annexes extra-embryonnaire ainsi que dans l'asymétrie de l'embryon.

Les BMPs sont d'importants facteurs régulant la chondrogenèse et l'ostéogenèse durant le développement embryonnaire (Hogan, 1996). Les BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 et BMP9 possèdent les effets ostéogéniques les plus forts. A l'âge adulte, BMP4 est surexprimé dans les fibro-dysplasies ossifiantes progressives. A l'heure actuelle, BMP2 est utilisée en clinique pour ses capacités ostéoinductrices.

Les BMPs interviennent également dans la formation des précurseurs hématopoïétiques. Le rôle de BMP4 a par exemple été mis en évidence dans l'induction de l'érythropoïèse humaine. BMP4, à de faibles concentrations, induit la prolifération des progéniteurs érythroïdes (Fuchs et al., 2002). BMP2, BMP4 et l'Activine-A sont impliqués dans l'érythropoïèse humaine (Maguer-Satta et al., 2003) et BMP4 régule la différenciation des mégacaryocytes (Jeanpierre et al., 2008).

La régulation de l'adiposité fait également intervenir la famille des BMP. BMP4 est considérée comme la protéine favorisant l'adipogenèse blanche, tandis que BMP7 oriente les précurseur mésenchymateux vers une différenciation adipocitaire brune (Zamani and Brown, 2011).

La signalisation BMP est également importante dans le maintien de l'état pluripotent des cellules souches embryonnaires et somatiques (Ying et al., 2003) (Watabe and Miyazono, 2009). De plus, la signalisation BMP synergise avec les facteurs de transcription OKMS (Oct4, Klf4, c-Myc et Sox2) au cours du processus de reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches (Samavarchi-Tehrani et al., 2010).

#### 2. Le développement cardiaque

##### *Les ligands*

BMP2 a été historiquement le premier membre de la famille impliqué dans le développement cardiaque. Les embryons *Bmp2*<sup>-/-</sup> meurent à mi-gestation et présentent un retard dans le développement cardiaque de même qu'une localisation anormale du cœur (Zhang and Bradley, 1996). L'invalidation de BMP4 dans les cardiomyocytes a permis de révéler son rôle dans la septation atrioventriculaire, bien qu'elle n'affecte pas la formation du coussin atrioventriculaire (Jiao et al., 2003).

BMP5, 6 et 7 sont redondantes dans la formation cardiaque. Les doubles invalidations de BMP5/BMP7 et de BMP6/BMP7 sont létales, entre autre du fait de défauts cardiaques. Les souris invalidées pour un seul de ces gènes n'ont aucun phénotype cardiaque. BMP5 et 7 sont exprimés

dans le croissant cardiaque et au cours des événements ultérieurs. Leur absence cause un délai dans la formation du cœur, qui continue néanmoins à se former, d'une manière désorganisée (absence de septation et trabéculatation réduite). Les embryons présentent également un développement anormal des arches branchiales et meurent à E10.5 (Solloway and Robertson, 1999). L'invalidation combinée de BMP6 et de BMP7 conduit pour sa part à des défauts dans la formation des coussins atriventriculaires et de l'OFT (outflow tract), et en conséquence à des problèmes de formation des valves cardiaques. La septation des chambres est également affectée et les embryons meurent entre E10.5 et E15.5 (Kim et al., 2001).

BMP10, dont les fonctions cardiaques seront décrites en détail plus loin, est une cytokine cardiaque majeure. Elle est impliquée dans la prolifération des cardiomyocytes à mi-gestation et est en conséquence déterminante dans le processus de trabéculatation (Chen et al., 2004). Elle est d'ailleurs largement exprimée dans les trabécules et son invalidation est létale à mi-gestation (Chen et al., 2004).

Récemment, des expériences de parabiose hétérochronique ont permis de mettre en évidence le rôle de BMP11 dans la protection contre l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge. Ces expériences consistent à joindre et à apposer les tissus de 2 animaux de manière à ce qu'ils développent une circulation commune. Les taux de BMP11 diminuant avec l'âge, le fait de relier un vieil animal avec un jeune permet de diminuer l'hypertrophie cardiaque chez le plus âgé (Loffredo et al., 2013).

### Les récepteurs

L'invalidation d'*Alk2* et d'*Alk3* conduit à une létalité embryonnaire au stade de la gastrulation. Cependant l'invalidation de *Alk3* dans les cardiomyocytes a permis de mettre en évidence son implication dans la trabéculatation, la compaction du myocardium, la septation et dans la formation des coussins endocardiaux. Ce dernier processus dépend d'une production de TGF $\beta$ 2 ALK3-dépendante qui va agir de manière paracrine pour favoriser l'EndMT (Endothelial-to-mesenchymal transition) au niveau du coussin atrioventriculaire (Gaussin et al., 2002). L'invalidation conditionnelle d'*Alk2* dans les cellules de l'endocarde conduit aussi à des défauts dans l'induction de l'endoMT et entraîne en conséquence des anomalies de formation des valves et du septum (Wang et al., 2005). Le récepteur de type II BMPR2 joue probablement un rôle dans ce processus puisque des défauts de valves et de septation de l'OFT sont observés chez les souris exprimant une forme de *BmprII* dépourvue de site de liaison aux ligands (Delot et al., 2003). La souris *ActrIIb*<sup>-/-</sup> présente aussi de multiples anomalies cardiaques incluant des défauts de septation atrioventriculaires (Oh and Li, 1997).

Pour ce qui est des corécepteurs, l'Endogline apparaît être impliquée dans le développement cardiaque. Les embryons *Eng*<sup>-/-</sup> présentent des ventricules et des OFT dilatés ainsi qu'un looping cardiaque anormal (Arthur et al., 2000). Le betaglycan est aussi impliqué dans la trabéculatation et la septation. Les embryons invalidés pour le betaglycan présentent en effet des défauts dans ces 2 processus et meurent au cours de leur développement embryonnaire (Compton et al., 2007).

### Les Smads

L'invalidation de *Smad5* entraîne un défaut dans l'enroulement du tube cardiaque létal au stade embryonnaire (Chang et al., 2000). L'invalidation de *Smad6* entraîne une hyperplasie cardiaque ainsi qu'un défaut des valves et du septum entraînant une rapide mortalité postnatale (Galvin et al., 2000). L'invalidation de *Smad4* dans les cellules endothéliales conduit aussi à des malformations cardiaques avec un cœur élargi, et une absence du coussin endocardiaque (Lan et al., 2007).

## 3. Le développement vasculaire

### Les ligands

Les invalidations des BMPs n'ont pas donné de phénotype vasculaire, peut-être suite à une redondance entre les BMPs. Certains embryons invalidés pour BMP4 présentent des défauts dans la formation des îlots sanguins suggérant une implication de BMP4 dans la vasculogénèse (Winnier et al., 1995).

### Les récepteurs

Deux invalidations conditionnelles d'*Alk3* ont été réalisées. L'invalidation d'ALK3 dans les cellules VEGFR2-positives est létale à E10.5 des suites de malformations cardiaques mais surtout de graves anomalies vasculaires. Ce sont des défauts de maturation des vaisseaux qui sont observés, avec notamment un faible recrutement de VSMC (Park et al., 2006). L'inactivation d'ALK3 dans les cellules de muscle lisse et les cardiomyocytes aboutit aussi à un défaut de recouvrement des cellules des VSMC (El-Bizri et al., 2008). Cette redondance des phénotypes suggère un rôle d'ALK3 et de ses ligands davantage les VSMC que dans les cellules endothéliales.

ALK1 est un récepteur clé dans le déroulement de l'angiogenèse physiologique. Les souris invalidées pour *Alk1* meurent autour de E10.5 suite à des défauts d'angiogenèse (Urness et al., 2000) (Oh et al., 2000). Dans ces souris, le plexus vasculaire se forme normalement, mais le réseau vasculaire ne peut pas se développer que ce soit dans le sac vitellin ou dans l'embryon. Ces embryons présentent entre autre une vascularisation dilatée et immature du sac vitellin et des fistules artério-veineuses, avec notamment une fusion de l'aorte dorsale et de la veine cardinale. Le recrutement des VSMC est également défaillant. L'invalidation du gène orthologue de *Alk1* chez le poisson zèbre, « violet beaugarde » (*vbg*) aboutit aussi à une létalité embryonnaire consécutive à une angiogenèse défaillante (Roman et al., 2002). La délétion d'*Alk1* dans les cellules endothéliales spécifiquement a été faite en 2008 (Park et al., 2008). Les auteurs ont exprimé la recombinaison CRE sous le contrôle d'un promoteur L1 qui est activé après E10.5 ce qui permet de ne pas interférer avec la formation cardiaque. Les vaisseaux du sac vitellin sont tortueux, dilatés avec des connexions directes anormales entre des veines et des artères. Cette invalidation est létale. La délétion inducible d'ALK1 dans les cellules endothéliales a permis d'étudier le rôle d'ALK1 dans la vascularisation adulte. L'invalidation à l'âge adulte conduit aussi à une létalité dans les deux semaines pour les femelles et trois pour les mâles. Cette létalité est liée au développement de malformations artério-veineuses (Park et al., 2009).

Concernant les récepteurs de type 2, la délétion totale de *Bmpr2* est létale (Delot et al., 2003). En 2007, une souris transgénique surexprimant un shRNA (short hairpin RNA) qui réduit de 70 à 90 % l'expression de BMPR2 a été créée (Liu et al., 2007). Cette souris est viable mais présente

après la naissance des dilatations des vaisseaux et un défaut de recouvrement par les VSMC, des anomalies qui peuvent entraîner des hémorragies.

L'invalidation de l'endogline, récepteur de type 3, entraîne une mortalité embryonnaire suite à des défauts vasculaires très importants. Les défauts dans la vascularisation du sac vitellin et de l'embryon ainsi que dans le recouvrement par les cellules de muscle lisse ressemblent à ceux rencontrés lors de l'invalidation d'ALK1 (Bourdeau et al., 1999) (Li et al., 1999) (Arthur et al., 2000). L'invalidation postnatale de l'endogline dans les CE altère l'angiogenèse de la rétine (Mahmoud et al., 2010). L'angiogenèse est totalement anormale avec un défaut de migration et une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales. Des jonctions artério-veineuses directes sont aussi observées, faisant penser au phénotype de la maladie de Rendu-Osler. L'invalidation de bêtaglycan entraîne une létalité embryonnaire à E 14.5. Les embryons meurent d'une insuffisance cardiaque causée par un réseau coronaire peu développé qui trouve son origine dans un défaut de vasculogenèse (Compton et al., 2007).

### Les Smads

L'invalidation de *Smad5* donne un phénotype vasculaire proche de celui de l'invalidation d'*Alk1* et de l'endogline (Chang et al., 1999) (Yang et al., 1999). Par contre, l'invalidation conditionnelle de *Smad5* dans les CE ou les VSMC ne donne aucun phénotype (Umans et al., 2007), ce qui suggère une redondance avec *Smad1* et 8. En effet, la double invalidation de *Smad1* et *Smad5* dans les CE entraîne une dérégulation du bourgeonnement, en lien avec une altération de la voie NOTCH (Moya et al., 2012). Des défauts mineurs de l'angiogenèse du sac vitellin sont observés chez les souris *Smad1*<sup>-/-</sup> (Lechleider et al., 2001). L'invalidation de *Smad8* est viable et entraîne chez les adultes des défauts dans la vasculature pulmonaire avec une hyperplasie des VSMC et un épaississement de la média (Huang et al., 2009).

La délétion spécifique de *Smad4* dans les CE est létale à E10.5 des suites de défauts cardiovasculaires, avec notamment une diminution du bourgeonnement des vaisseaux et du remodelage vasculaire (Lan et al., 2007). En plus de leurs défauts cardiaques, les quelques souris viables *Smad6*<sup>-/-</sup> présentent une calcification vasculaire et une hypertension systémique (Galvin et al., 2000).

### La signalisation Smad-indépendante

L'invalidation de *Tak1*, une kinase activée, entre autre, lors de la signalisation Smad indépendante, conduit à un phénotype en tout point semblable à celui de l'inactivation d'*Alk1* que ce soit chez la souris ou chez le poisson zèbre (Jadrich et al., 2006). L'invalidation d'*Alk1* et de *Tak1* dans le poisson zèbre donne des défauts angiogéniques encore plus prononcés. Par contre la surexpression de *Tak1* dans un poisson zèbre invalidé pour *Alk1* restaure partiellement un phénotype normal (Jadrich et al., 2006).

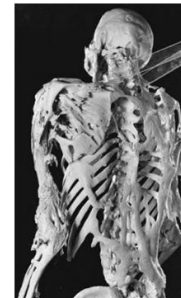
### Les gènes cibles de la voie BMP

Les Inhibiteurs de la différenciation (Id) 1 et 3 sont des facteurs de transcription fortement induits par les BMPs via la voie Smad (Korchynskiy and ten Dijke, 2002). La double invalidation de ces deux gènes donnent un phénotype létal à E13.5 avec notamment des défauts d'angiogenèse (vaisseaux dilatés, hémorragies craniales) (Lyden et al., 1999).

#### 4. Les pathologies humaines de la voie BMP

Les pathologies humaines héréditaires liées à la voie des BMP sont nombreuses. Quelques exemples de pathologies sont présentés dans le Tableau 10. Les pathologies vasculaires (maladie de Rendu-Osler et Hypertension Artérielle Pulmonaire) sont détaillées dans les 2 paragraphes suivants.

	Protéine	Maladie
Récepteur de type 1	ALK1	Maladie de Rendu-Osler, type 2.
	ALK2	FOP: Fibrodysplasie Ossifiante Progressive, Maladie de l'homme de pierre.
	ALK3	Syndrome de Polyposie juvénile.
	ALK6	Bradydactylie A2: raccourcissement des doigts et des orteils.
Récepteur de type 2	BMPR2	Hypertension artérielle pulmonaire
Co-récepteurs	Endogline	Maladie de Rendu-Osler, type 1.
	Hemojuvéline	Hémochromatose: surcharge en fer
Ligands	BMP4	Microphthalmie type 6
	BMP14	Bradydactylie A2 Chondrodysplasie Héréditaire
	BMP15	Dysgénésie ovarienne.
Inhibiteur	Noggin	Symphalangisme proximal.



Maladie de l'homme de pierre



Bradydactylie

**Tableau 10 Pathologies humaines liées à la signalisation BMP.**

D'après (Massague et al., 2000) et <http://ghr.nlm.nih.gov/BrowseConditions>

#### La maladie de Rendu-Osler

L'HHT ou maladie de Rendu-Osler, du nom des médecins ayant caractérisé cette pathologie, est une maladie génétique autosomique dominante à pénétrance quasi-complète (98% au-delà de 50 ans) et expression variable. Son incidence est de 1/10000 habitants. Dans certaines régions, comme le Haut Jura Français, l'incidence peut atteindre 1/3000 habitants. Les symptômes de la maladie n'apparaissent pas à la naissance, mais se développent avec l'âge. Les critères diagnostiques ont été établis lors d'une conférence de consensus à Curaçao (Shovlin et al., 2000). Quatre critères sont observés : 1) la survenue d'épistaxis (saignements de nez, présents chez 95 % des patients), 2) la présence de télangiectasies (dilatations des petits vaisseaux périphériques) au niveau de la peau ou des muqueuses buccales (présentes chez 84 % des patients), 3) l'atteinte viscérale (télangiectasies pouvant être hémorragiques dans le tube digestif et/ou fistules artério-veineuses dans certains organes), 4) l'histoire familiale (positive chez 98 % des patients) (Plauchu et al., 1989). Un patient est déclaré malade s'il est positif pour au moins trois des critères (Dupuis-Girod et al., 2010).

Trois gènes sont responsables de cette pathologie. La grande majorité des cas (> 80 %) est causée par des mutations du gène **ENG** codant pour l'endogline et responsable de HHT-1 (McAllister et al., 1994), ou du gène **ACVRL1**, codant pour ALK1 et responsable de HHT-2 (Johnson et al., 1996). Des mutations de **MADH4**, codant pour Smad4, sont retrouvées sur des patients atteints d'une combinaison du syndrome de la polyposie juvénile (causé aussi par des mutations d'ALK3) et HHT (Gallione et al., 2006).

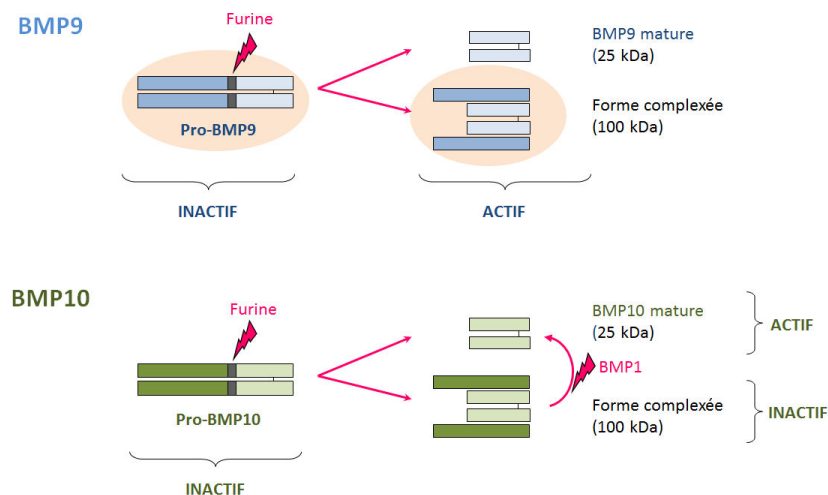
## L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

L'HTAP regroupe différentes maladies caractérisées par une prolifération cellulaire anormale qui entraîne une augmentation de la résistance artérielle pulmonaire, une occlusion de la micro-vascularisation pulmonaire et une défaillance ventriculaire droite. Le diagnostic est posé par un cathétérisme cardiaque droit qui met en évidence une tension artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25mmHg au repos (ou 40mmHg à l'effort). L'HTAP est une maladie rare dont l'incidence est de 2 cas pour 1 million d'habitants. Environ 10% des HTAP sont d'origine familiale. Les HTAP familiales sont associés à des mutations du récepteur **BMPR2** et plus rarement d'**ACVRL1**, **ENG**, et **SMAD8** (Fujiwara et al., 2008).

## IV. BMP9 et BMP10

### 1. Structure, Synthèse et Formes circulantes

BMP9 (appelée aussi GDF2) constitue avec BMP10 une sous-famille de la famille TGF $\beta$ . BMP9 est synthétisé sous forme de dimère associé de manière non covalente à son prodomaine. La forme mature de BMP9 et le complexe BMP9/prodomaine sont tous deux actifs dans différents tests biologiques (Brown et al., 2005). Le travail de Marie Bidart a permis de faire avancer les connaissances sur les formes circulantes et le processing de BMP9. Chez l'homme, le site d'expression principal de BMP9 est le foie, et plus précisément, les hépatocytes et les cellules épithéliales des canaux biliaires. Elle circule sous 2 formes, une forme active, c'est à dire capable d'activer le récepteur Alk1, et une forme inactive, incapable de le faire. La forme active circulante correspond à la forme mature de BMP9 associée à son prodomaine, tandis que le BMP9 inactif correspond à la forme dimérique non-processée. La furine est capable d'activer cette forme inactive non-processée (Figure 49) (Bidart et al., 2012). BMP9 circule à des taux de l'ordre 6ng/mL chez l'adulte (David et al., 2008).



**Figure 49 Les différentes formes de BMP9 et de BMP10 et leur activité.**

Pour BMP9, l'activité est définie comme la capacité à activer le récepteur Alk1 et à déclencher une réponse Smad dépendante (Bidart et al., 2012). Pour BMP10, l'activité correspond à la capacité à induire l'expression du gène Id3, un gène Smad dépendant de la voie BMP (Sengle et al., 2011). Les formes de BMP9 soulignées en rose sont les formes plasmatiques circulantes humaines. Les formes circulantes plasmatiques de BMP10 ne sont pas connues. Les éclairs roses symbolisent le clivage et sont associés à la protéase impliquée.

BMP10 est principalement une cytokine cardiaque, bien qu'elle soit exprimée également en faible quantité dans le foie, les poumons (Neuhaus et al., 1999) et le cerveau (Yan et al., 2012). Au

cours du développement embryonnaire, BMP10 est exprimée dans la partie trabéculée du cœur, cette expression se restreint ensuite aux oreillettes en fin de la gestation, puis uniquement à l'oreillette droite pendant la vie adulte (Chen et al., 2004). BMP10 est exprimée seulement par les cellules myocardiales qui forment les trabécules (Neuhaus et al., 1999). La furine est la principale enzyme de clivage du prodomaine de BMP10, et elle agit principalement dans le milieu intracellulaire. Cependant, le processing de la proBMP10 peut également avoir lieu à la surface de la membrane plasmique (Susan-Resiga et al., 2011). Une fois le processing effectué, le prodomaine de BMP10 interagit avec le domaine N-terminal de la fibrilline-1, une protéine de la MEC (Sengle et al., 2008). Et contrairement à BMP9, l'association de BMP10 mature avec son prodomaine forme un complexe inactif. Le complexe inactif de BMP10 peut être activé par clivage, et BMP1 (qui n'appartient en fait pas à la famille des BMP) apparaît être l'enzyme responsable de cette activation, et ce de manière relativement spécifique (Figure 49) (Sengle et al., 2011). BMP10 a été décrite pour la première fois comme circulant dans le sérum par une approche protéomique en 2008 (Souza et al., 2008).

Les protéines régulatrices de l'expression de BMP9 ne sont pas connues. A ce jour, 12 protéines sont décrites pour réguler l'expression de BMP10 (Tableau 11).

Protéines augmentant l'expression de BMP10	NOTCH1	(Grego-Bessa et al., 2007)
	BRG1	(Hang et al., 2010)
	TBX20	(Chakraborty and Yutzey, 2012)
	BAF250a	(Lei et al., 2012)
	Myocardin	(Huang et al., 2012)
Protéines diminuant l'expression de BMP10	FKBP12	(Chen et al., 2004)
	NKX2.5	(Chen et al., 2004)
	SMAD4	(Song et al., 2007)
	PITX2	(Tessari et al., 2008)
	PCR2	(He et al., 2012)
	Numb/Numbl-like	(Yang et al., 2012)
	IRX3 IRX5	(Gaborit et al., 2012)

**Tableau 11 Les protéines régulatrices de l'expression de BMP10.**  
La majorité de ces protéines sont liées au développement cardiaque.

## 2. Transduction du signal

### Les récepteurs

En 2005, Brown publie les premières données sur un récepteur potentiel pour BMP9 : ALK1-Fc inhibe BMP9 dans un test de phosphatase alcaline sur des cellules C2C12, et ALK1 montre une forte affinité pour BMP9 avec la technique de Biacore (Brown et al., 2005). C'est en 2007 que BMP9 et BMP10 ont réellement été identifiés comme les ligands physiologiques d'ALK1 par notre équipe



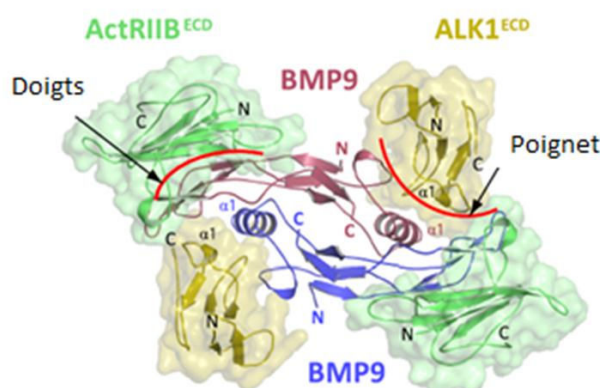
(David et al., 2007a), un résultat qui a été ensuite confirmé par un autre groupe, pour ce qui est de BMP9.

Dans des cellules endothéliales, les récepteurs de type 2 impliqués sont BMPRII, ACTR2A et ACTR2B (Scharpfenecker et al., 2007). Il faut noter que l'EC50 de BMP9 pour ALK1 est de l'ordre de 50pg/mL (David et al., 2007a). Mais des fortes doses de BMP9 sont aussi capables d'activer d'autres récepteurs de type 1 : ALK2 (en présence de BMPRII ou de ACTR2 (Scharpfenecker et al., 2007). De plus, avant que ALK1 n'ait été décrit comme le récepteur de BMP9 et de BMP10, Sabine Mazerbourg avait montré que BMP10 pouvait interagir avec ALK3, ALK6, BMPRII et ACTR2A (Mazerbourg and Hsueh, 2006; Mazerbourg et al., 2005).

L'affinité des ligands pour leurs récepteurs est différente : ALK1 est activé avec des concentrations en ligands de l'ordre de 50pg/mL, tandis que les autres récepteurs ont besoin de plusieurs dizaines de ng/mL. Ces données sont importantes dans la réflexion sur le rôle de BMP9 et de BMP10 in vivo, d'autant plus que BMP9 circule dans le plasma à des taux de plusieurs ng/mL.

ALK1 est un récepteur décrit comme étant principalement exprimé à la surface des CE, et davantage dans les artères que dans les veines. Cependant, il serait également présent dans d'autres types cellulaires comme les SMC, les fibroblastes de la peau ou encore les cellules de la crête neurale. Il est exprimé dès E6.5 dans les sites de vasculogenèse. Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, plusieurs variants d'épissage ont été mis en évidence, sans que les fonctions différentielles des protéines soient connues (Gonzalez-Nunez et al., 2013).

La structure de ALK1 dans sa liaison à BMP9 a été réalisée l'année passée par 2 groupes, confirmant par cristallographie la liaison entre BMP9 et ALK1 (Figure 50) (Townson et al., 2012) (Mahlawat et al., 2012). Par contre, le complexe avec BMP10 n'a pas été réalisé.



**Figure 50 Structure du complexe ternaire de BMP9, ALK1<sup>ecd</sup> et ActRIIB<sup>ecd</sup>.**

Le domaine « poignet » de BMP9 interagit avec ALK1, tandis que le domaine des « doigts » interagit avec ActRIIB. (Townson et al., 2012)

Les résultats du groupe de Grinberg montrent par ailleurs que BMP9 présente des affinités différentes pour les récepteurs de type 2, ce qui n'est pas le cas pour BMP10. Le récepteur de type 2 pour lequel BMP9 possède le plus d'affinité est ACTR2B, suivi de BMPRII et enfin ACTR2A (Figure 51). De plus, la forte affinité d'ALK1 pour BMP9 est liée à la présence d'un site d'interaction supplémentaire (3 sites au total) par rapport aux interactions précédemment décrites de BMP2/ALK3 et BMP14/ALK6 (Townson et al., 2012).



**Figure 51 Affinité de BMP9 et de BMP10 pour leurs récepteurs.**

D'après (Townson et al., 2012)

La réponse induite par BMP9 est augmentée en présence du corécepteur Endogline (David et al., 2007a). Une équipe d'Accéléron Pharma a récemment confirmé l'implication de l'endogline dans la signalisation BMP9/BMP10 en montrant que l'endogline liait spécifiquement BMP9 et BMP10 avec une haute affinité. Son affinité pour BMP10 est cependant un peu plus faible que pour BMP9 (Castonguay et al., 2011).

### La signalisation

La signalisation canonique de BMP9 et BMP10 nécessite la phosphorylation des SMAD 1/5/8. BMP9 peut aussi signaler par des voies SMAD-indépendantes. C'est le cas dans le processus de migration des HMVECd qui est inhibé par une forme constitutivement active d'ALK1 de manière JNK et ERK dépendante (David et al., 2007b). Par ailleurs BMP9 inhibe la phosphorylation de ERK dans des CE de poumon de souris (Liu et al., 2007). La signalisation BMP9/ALK1 serait également capable d'induire la phosphorylation de SMAD2 dans les HPAEC. Cette phosphorylation dépend du récepteur de type 2 recruté, et c'est ACTRIIA qui serait le récepteur impliqué dans l'activation de SMAD2 (Upton et al., 2009).

La transduction du signal BMP9/ALK1 dépend également de la présence d'inhibiteurs. Le groupe de Bostrom a démontré récemment que BMPER se lie et inhibe préférentiellement BMP9. BMPER participe au feedback négatif de la signalisation BMP/ALK1 car il est induit en réponse à BMP9 (Yao et al., 2012b). Le rôle de BMPER est cependant complexe puisqu'en fonction du contexte cellulaire il peut être agoniste ou antagoniste des BMP (Yao et al., 2012b). BMP9 régule également positivement l'expression de la noggine, un autre inhibiteur des BMP (Lopez-Coviella et al., 2005). Cependant, BMP9 et BMP10 présentent la particularité, parmi toutes les BMP, de ne pas être sensibles à la noggine, du fait de la présence d'un résidu particulier dans leur séquence (Seemann et al., 2009).

## 3. Fonctions

Les fonctions de BMP9 et de BMP10 sont liées aux récepteurs qu'elles vont activer. Depuis qu'il est connu que ALK1, exprimé à la surface des EC, est le récepteur de BMP9 et BMP10, les fonctions vasculaires de BMP9 et de BMP10 sont largement étudiées. Elles possèdent cependant de nombreuses autres fonctions liées à l'activation des autres récepteurs, ALK2,3 et 6. Par ailleurs, il faut noter que le KO de *Bmp9* n'avait pas été décrit lorsque j'ai entamé ma thèse. Pour ce qui est de *Bmp10*, ce KO est létal à mi-gestation du fait de graves défauts cardiaques, ce qui souligne le rôle de BMP10 dans le développement du cœur et fera l'objet d'un paragraphe particulier.

#### **a. Ostéogenèse et Chondrogenèse.**

Comme leur nom le laisse sous-entendre, BMP9 et BMP10 possèdent des effets ostéogéniques et chondrogénique, ceux de BMP10 apparaissant cependant plus faibles (Bessa et al., 2009). Chez le rat, l'injection d'un adénovirus exprimant BMP9 permet de réparer des lésions osseuses. Les effets ostéogéniques de BMP9 seraient même plus importants que ceux des autres BMP (BMP 2, 4, 6, 7) (Li et al., 2003).

#### **b. Système nerveux central.**

BMP9 agit également sur le système nerveux central en induisant la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones cholinergiques (Lopez-Coviella et al., 2000). BMP9 induit la sécrétion de NGF (nerve growth factor) par une population particulière de neurones cholinergiques, les BFCN (basal forebrain cholinergiques neurons), une population qui exprime également spécifiquement ALK1 (Schnitzler et al., 2010).

#### **c. Homéostasie du glucose et du fer.**

En lien avec son site d'expression privilégié, le foie, BMP9 possède des fonctions au sein du métabolisme du fer et de celui du glucose.

La découverte de l'implication de BMP9 dans le métabolisme du glucose date de 2003 (Chen et al., 2003) et plus précisément d'une étude à grande échelle screenant les polypeptides sécrétés pouvant être impliqués dans le diabète. BMP9 participe à la baisse de la glycémie en inhibant la néoglucogénèse (par inhibition de l'expression de PEPCK), en favorisant la voie de synthèse des acides gras (augmentation de la transcription de la Malic Enzyme (ME) et de la Fatty Acid Synthase (FAS)), et en augmentant la synthèse de glycogène. Ces résultats ont été complétés en 2008 par l'équipe de Silvana Bordin qui montre que l'injection d'un anti-BMP9 à des rats entraîne une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (Caperuto et al., 2008). Ces résultats prometteurs n'ont paradoxalement pas été davantage explorés.

Le fer est un nutriment essentiel au fonctionnement de l'organisme, dont le taux circulant est régulé par une hormone peptidique clef : l'hépcidine. L'hépcidine responsable de l'inhibition de la ferroportine, la protéine chargée du transport du fer du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, dans les entérocytes, les macrophages et les hépatocytes. Bien que BMP6 soit la principale régulatrice de l'expression de l'hépcidine, BMP9 régule également de manière positive cette expression par les cellules du foie (Truksa et al., 2006).

#### **d. Fonctions vasculaires et cellules endothéliales**

Les rôles de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse sont soulignés par les données concernant leur récepteur ALK1. Dans un modèle murin, les souris invalidées pour Alk1 présentent des phénotypes létaux au cours du développement embryonnaire du fait de défauts vasculaires (Oh et al., 2000) (Urness et al., 2000). Chez l'homme, des mutations de ALK1 sont responsables de 2 pathologies vasculaires, l'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP) et la Maladie de Rendo-Osler.

Les rôles de BMP9 *in vitro* sur les EC restent controversés. Suivant l'origine des EC utilisées, les effets de BMP9 sont anti-angiogéniques (Scharpfenecker et al., 2007) (David et al., 2007a) ou pro-angiogéniques (Suzuki et al., 2010). *In vivo*, plusieurs modèles plaident pour un rôle anti-angiogénique de BMP9 (Scharpfenecker et al., 2007) (David et al., 2008). BMP9 induit également la

vasoconstriction des vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'embryons de poulet (David et al., 2008). Mais là encore, des données contradictoires existent puisque BMP9 est décrit comme pro-angiogénique dans la vascularisation d'un implant de Matrigel et dans un modèle de tumeur pancréatique (Suzuki et al., 2010).

Les données *in vitro* sur BMP10 dans l'angiogénèse sont inexistantes. *In vivo*, dans un modèle de CAM, le traitement par BMP10 augmenterait significativement le nombre de vaisseaux par disque (Mitchell et al., 2010). Cependant, des résultats très récents, utilisant le poisson zèbre comme modèle, démontrent que BMP10 agit via ALK1 pour limiter le nombre de cellules endothéliales et participe ainsi à la stabilisation du diamètre des artères (Laux et al., 2013).

Les fonctions de BMP9 et de BMP10 semblent versatiles dans le contexte de l'angiogénèse. Davantage d'études seraient nécessaires pour comprendre les déterminants des effets opposés qui peuvent être observés.

#### **e. Cancer**

Dans le contexte du cancer de l'ovaire, BMP9 possède un rôle pro-prolifératif sur des lignées de cellules cancéreuses ovariennes et il exerce ses effets via ALK2 et la phosphorylation de Smad1. De manière intéressante, alors que les ovaires sains ne sécrètent pas de BMP9, 25% des tumeurs ovariennes le sécrètent (Herrera et al., 2009).

BMP10 est décrit comme inhibant l'agressivité des cancers du sein (Ye et al., 2010), du pancréas (Ye et al., 2009) et de la vessie (Zhang et al., 2013a), mais les résultats de ces études sont discutables, notamment pour ce qui est des images d'Immuno-histo chimie (zones différentes présentées, absence du contrôle sans anticorps primaire) et de l'expression des gènes (le nombre de copies n'est pas rapporté à un gène de ménage).

#### **f. BMP10 dans le développement cardiaque**

En lien avec son site d'expression privilégié, le cœur, l'inactivation de *Bmp10* est létale à mi-gestation du fait de graves défauts cardiaques. Les embryons présentent une absence de trabécules dans la chambre ventriculaire commune ainsi qu'une réduction très importante de l'activité proliférative des cardiomyocytes. De plus, le développement des coussins endocardiaux est anormal dans l'OFT et dans l'AVC, deux sites de formation ultérieurs des valves cardiaques (Chen et al., 2004). L'ensemble de ces défauts est lié à l'induction par BMP10 de facteurs cardiogéniques importants, NKX2.5, MEF2C (Chen et al., 2004) et TBX20 (Zhang et al., 2011b) et à l'inhibition d'un inhibiteur du cycle cellulaire, p57<sup>kip2</sup> (Chen et al., 2004). L'induction de *Bmp10* doit être restreinte temporellement à la seconde moitié de la gestation, et dans le cas contraire les cardiomyocytes ne parviennent pas à passer du stade de l'hyperplasie, à celui de l'hypertrophie qui prévaut au cours de la période postnatale (Chen et al., 2006).

Cette première partie introductive a donc décrit les remodelages cardiovasculaires qui ont lieu au cours de la période périnatale. Pour chacun des trois processus, l'ambition était de présenter les bases moléculaires sur lesquelles reposent ces remodelages.

Dans la première partie consacrée au développement cardiovasculaire embryonnaire, le survol de ces bases moléculaires a été rapide du fait de la quantité de travaux traitant de ce sujet. Par contre, le développement lymphatique et le canal artériel ont fait l'objet d'investigations moins nombreuses. Le travail bibliographique sur les bases moléculaires de ces 2 processus est donc plus exhaustif. Mais cette moindre complexité (bibliographique), n'est que relative. Elle se renforce en effet considérablement dès que l'on s'intéresse en détail à une voie de signalisation et à ses régulations. C'est ce qui apparaît dans la dernière partie introductive consacrée à la famille des BMP. La description et la compréhension d'une voie de signalisation, qui peut s'avérer simple au premier abord, révèle très rapidement des niveaux insoupçonnés de régulations et de complexité.

Le travail réalisé au cours de cette thèse, et qui va maintenant être présenté, identifie deux nouveaux acteurs des remodelages vasculaires périnataux : BMP9 et BMP10. Il participe donc à une meilleure compréhension, mais également à une complexification, de ce champ scientifique.

# OBJECTIFS

---

L'équipe du Dr. Bailly travaille depuis plusieurs années sur la signalisation BMP9/BMP10/ALK1. C'est elle qui a démontré que BMP9 et BMP10 étaient les ligands physiologiques de haute affinité du récepteur ALK1 (David et al., 2007a). ALK1 étant exprimé à la surface des cellules endothéliales et les mutations de ce récepteur causant des pathologies vasculaires (Maladie de Rendu-Osler et Hypertension Artérielle Pulmonaire), l'équipe a ensuite orienté ses recherches sur le rôle de BMP9 dans l'angiogenèse. Dans ce cadre, elle a démontré que BMP9 était impliqué, *in vitro* et *in vivo*, dans la quiescence de l'angiogenèse (David et al., 2008).

L'invalidation de *Bmp9* chez la souris n'avait pas été publiée au début de ma thèse. Par contre, l'invalidation de *Bmp10* a été décrite en 2004, elle entraîne une létalité embryonnaire du fait de graves défauts cardiaques (Chen et al., 2004). Avec l'arrivée de la souris *Bmp9*-KO dans notre laboratoire au début de ma thèse, les premiers résultats sur la fonction de BMP9 dans l'angiogenèse allaient pouvoir être précisés. La période périnatale, qui constitue un temps d'intenses remodelages vasculaires et lymphatiques, s'est alors imposée pour étudier les rôles respectifs de BMP9 et de BMP10.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse a été d'étudier les rôles respectifs et combinés de BMP9 et de BMP10 dans les remodelages vasculaires périnataux. Cette problématique a été abordée à travers 5 aspects.

- 1- La maturation du réseau lymphatique et développement des valves, la période périnatale étant une phase de remodelage du réseau vasculaire lymphatique.
- 2- L'angiogenèse postnatale de la rétine, qui est un modèle d'étude de l'angiogenèse physiologique.
- 3- La fermeture du canal artériel, un remodelage vasculaire fondamental pour la survie du nouveau-né.
- 4- La gestation, qui correspond à une réactivation physiologique de l'angiogenèse, faisant de cette période un second modèle d'étude de l'angiogenèse physiologique.
- 5- La forme soluble du récepteur ALK1, un nouvel acteur potentiel dans le remodelage vasculaire, qui pourrait moduler la disponibilité de BMP9 et de BMP10.

# RESULTATS

---

## I. La maturation lymphatique et le développement des valves

### 1. Contexte de l'étude :

Depuis une dizaine d'années, le développement du réseau lymphatique fait l'objet d'études de plus en plus nombreuses. En ce qui concerne ALK1, le récepteur de type 1 de BMP9 et de BMP10, il a été démontré qu'il est exprimé par les LEC comme par les CE sanguines (Niessen et al., 2010). Par ailleurs, l'injection du domaine extracellulaire d'ALK1 (ALK1-Fc) entre le jour postnatal 1 (P1) et P5, chez des souris affecte le développement des capillaires lymphatiques des villosités intestinales et de la peau de la queue et de l'oreille (Niessen et al., 2010) (Niessen et al., 2011). Ces résultats suggèrent une implication des ligands de ALK1 dans les étapes tardives du développement lymphatique. Par ailleurs, les souris *Bmp9*-KO étant viables et fertiles, cela renforce l'idée que si BMP9 joue un rôle dans le développement lymphatique, c'est probablement au cours des étapes tardives de ce développement.

Dans ce contexte, nous avons évalué le rôle de BMP9 dans la maturation du réseau lymphatique en utilisant des souris *Bmp9*-KO. Les souris *Bmp9*-KO ont été obtenues grâce à une collaboration avec le Dr. Teresa Zimmers et le Pr. Se-Jin Lee du Johns Hopkins University School of Medicine de Baltimore, dans un fond génétique C57Bl6.

### 2. Résultats

Les résultats de ce travail ont récemment été publiés dans *Blood*, en juin 2013, sous le titre « Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation » (Levet et al., 2013). J'ai principalement participé à la partie in vivo de ce travail.



# blood

2013 122: 598-607  
Prepublished online June 5, 2013;  
doi:10.1182/blood-2012-12-472142

## **Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation**

Sandrine Levet, Delphine Ciais, Galina Merdzhanova, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Fabrice P. Navarro, Isabelle Texier, Jean-Jacques Feige, Sabine Bailly and Daniel Vittet

---

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/122/4/598.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Vascular Biology](#) (411 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub\\_requests](http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.

Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



## Regular Article

## VASCULAR BIOLOGY

## Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation

Sandrine Levet,<sup>1,2,3</sup> Delphine Ciais,<sup>1,2,3</sup> Galina Merdzhanova,<sup>1,2,3</sup> Christine Mallet,<sup>1,2,3</sup> Teresa A. Zimmers,<sup>4</sup> Se-Jin Lee,<sup>5</sup> Fabrice P. Navarro,<sup>6</sup> Isabelle Texier,<sup>6</sup> Jean-Jacques Feige,<sup>1,2,3</sup> Sabine Bailly,<sup>1,2,3</sup> and Daniel Vittet<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1036, Grenoble, France; <sup>2</sup>Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Direction des Sciences du Vivant, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, France; <sup>3</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble, France; <sup>4</sup>Department of Cancer Biology and Surgery, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA; <sup>5</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD; and <sup>6</sup>Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Laboratoire d'Electronique de Technologie de l'Information, Campus d'innovation pour les micro et nanotechnologies Grenoble, France

## Key Points

- BMP9 is required for lymphatic valve formation.
- Mice deficient in *Bmp9* exhibit reduction in lymphatic draining efficiency.

Lymphatic vessels are critical for the maintenance of tissue fluid homeostasis and their dysfunction contributes to several human diseases. The activin receptor-like kinase 1 (ALK1) is a transforming growth factor- $\beta$  family type 1 receptor that is expressed on both blood and lymphatic endothelial cells (LECs). Its high-affinity ligand, bone morphogenetic protein 9 (BMP9), has been shown to be critical for retinal angiogenesis. The aim of this work was to investigate whether BMP9 could play a role in lymphatic development. We found that *Bmp9* deficiency in mice causes abnormal lymphatic development. *Bmp9*-knockout (KO) pups presented hyperplastic mesenteric collecting vessels that maintained LYVE-1 expression. In accordance with this result, we found that BMP9 inhibited LYVE-1 expression in LECs in an ALK1-dependent manner. *Bmp9*-KO pups also presented a significant reduction in the number and in the maturation of mesenteric lymphatic valves at embryonic day 18.5 and at postnatal days 0 and 4. Interestingly, the expression of several genes known to be involved in valve formation (*Foxc2*, *Connexin37*, *EphrinB2*, and *Neuropilin1*) was upregulated by BMP9 in LECs. Finally, we demonstrated that *Bmp9*-KO neonates and adult mice had decreased lymphatic draining efficiency. These data identify BMP9 as an important extracellular regulator in the maturation of the lymphatic vascular network affecting valve development and lymphatic vessel function. (*Blood*. 2013;122(4):598-607)

## Introduction

The lymphatic vasculature is essential for the maintenance of normal fluid balance and for the immune response. It consists of a network of vessels that drain protein-rich lymph from the extracellular space back to the blood circulation, which absorbs dietary fatty acids and is involved in the traffic of immune cells.<sup>1</sup> Lymphatic vessels may also serve as a conduit to lymph nodes and thereby participate in systemic metastasis of cancer cells. Hypoplasia, disruption or dysfunction of the lymphatic vessels, impair the ability of the lymphatic vasculature to collect and transport fluids and lead to lymphedema.<sup>1,2</sup>

The mammalian lymphatic system has been shown to originate from embryonic veins. Lymphatic vessel development starts at embryonic days (E) 9.5 to 10.5 in mice. After formation of the primary lymph sacs, further expansion leads to the formation of a primary lymphatic vascular plexus that, through subsequent remodeling and maturation, will provide a hierarchical network of lymphatic capillaries and lymphatic collecting vessels.<sup>1,3</sup> During this vessel specification, maturation of collecting vessels is accompanied by the downregulation of lymphatic marker molecules such as LYVE-1, the acquisition of partial smooth muscle cell coverage, and the formation of intraluminal valves.<sup>4-6</sup> Lymphatic valves are essential

components that ensure unidirectional lymph flow. They develop from E15.5 to early postnatal days in mice.<sup>6</sup> Few key molecular regulators of their formation and/or their maturation have been identified. It was shown that the mechanical stimulus caused by lymph flow establishes the location where valves develop by upregulating the expression of *Foxc2*. *Foxc2* cooperates with *Prox1* to control *Connexin37* (*Cx37*) expression and to activate *NFATc1*/Calcineurin signaling.<sup>7,8</sup> Other molecular regulators such as *EphrinB2*, integrin  $\alpha 9$ , *Connexin43* (*Cx43*), *Semaphorin3a*, and *Neuropilin1* (*Nrp-1*) have been reported to be important for either lymphatic valve formation, elongation of lymphatic valve leaflets, or valve maturation.<sup>5,8-12</sup> However, still not much is known concerning the extracellular factors that govern valve development.

The activin receptor-like kinase 1 (ALK1) is a type 1 receptor of the transforming growth factor- $\beta$  family that is specifically expressed on endothelial cells.<sup>13</sup> We have previously shown that bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 bind with high affinity to ALK1.<sup>14</sup> BMP9 and BMP10 have been recently shown to control postnatal retinal vascularization.<sup>15</sup> Interestingly, ALK1 is expressed on both blood endothelial cells and lymphatic endothelial cells

Submitted December 7, 2012; accepted June 2, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 5, 2013; DOI 10.1182/blood-2012-12-472142.

S.L. and D.C. contributed equally to the study. S.B. and D.V. are co-last authors.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2013 by The American Society of Hematology

(LECs) and it was recently shown that LECs respond to BMP9 and BMP10 by inducing Smad6 expression; this effect is mediated by ALK1.<sup>16</sup> It was further shown that treatment of neonatal mice between postnatal day 1 (P1) and P3 with the ALK1 extracellular domain (ALK1Fc) impaired the development of the honeycomb pattern of lymphatic vessels of the tail dermis and of the intestinal villi.<sup>16</sup> Therefore, these data indicated a role for ALK1 ligands in the formation of lymphatic capillaries at early postnatal stages. We have reported that BMP9 is present in plasma and that its circulating level is elevated in mouse embryos just before birth and during early postnatal life,<sup>14,15,17</sup> consistent with a potential role for BMP9 in the lymphatic system maturation that occurs during this period.

To investigate the role of BMP9 on lymphatic maturation and valve formation, we used *Bmp9*-knockout (KO) mice, which are viable and do not present any obvious phenotype.<sup>15</sup> We report here that *Bmp9* deficiency leads to defects in both lymphatic capillaries and collecting vessel maturation and in valve formation. This abnormal lymphatic vascular patterning resulted in a decrease in draining efficiency both in neonates and in adult mice. Several previously identified genes and proteins involved in lymphatic vessel maturation and valve formation were identified as molecular targets of BMP9 (LYVE-1, Foxc2, Cx37, EphrinB2, and Nrp-1). Taken together, these data provide evidence for a critical role of BMP9 in the development of lymphatic vessels.

## Methods

### Mice

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. The generation of *Bmp9*-KO mice and genotyping were described previously.<sup>15</sup> Mice were maintained on a C57BL/6 genetic background.

### Whole-mount immunofluorescent stainings

Mesenteries and skins were dissected and attached with pins on elastomer-coated plates and fixed overnight with 4% paraformaldehyde diluted in phosphate-buffered saline (PBS). Whole-mount immunofluorescent stainings were performed essentially as previously described.<sup>7,18</sup> After washes with PBS, tissues were blocked overnight with PBS containing 2% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100. They were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies used are listed in the supplemental Methods. Alexa fluor 488- or Cyanin-3-conjugated affinity-purified minimal crossreactivity secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used for the staining. After extensive washes, samples were postfixed in 4% paraformaldehyde and mounted with Fluorsave reagent (Calbiochem). The images were acquired and analyzed using either a ZEISS Axio-observer Z1 inverted fluorescence microscope and Axiovision 4.8 software or a LEICA scanning confocal microscope (TCS SP2). All images were processed with Adobe Photoshop CS5 software.

### LEC culture, treatment, and siRNA transfection

Human dermal LECs were obtained from LONZA Biosciences and cultured in EGM-2 medium containing endothelial cell growth supplements with 5% fetal bovine serum. They were used between passage 5 and 7. For small interfering RNA (siRNA) experiments, LECs were transfected with 10 nM siRNA using RNAimax (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. All siRNAs were purchased from Ambion (Alk1, #s986, and siRNA scramble, AM4613). Cells were stimulated in serum-free medium with 10 ng/mL recombinant human BMP9 (R&D Systems) at the times indicated.

### Quantitative real-time PCR

Total RNAs were extracted at the indicated times using the Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel). First-strand cDNAs were synthesized from 1 µg total RNA by reverse transcription using the iScript system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using a Bio-Rad CFX96 apparatus and qPCR Master Mix (Promega). Relative quantification of gene expression was normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) messenger RNA (mRNA) expression level. Sequences of the PCR primers used are listed in supplemental Table 1.

### Flow cytometry analysis

For flow cytometry analysis, cells were detached by incubation for 30 minutes at 37°C in nonenzymatic cell dissociation buffer. After 2 washes in PBS, cells were stained with LYVE-1 antibodies in PBS containing 2% bovine serum albumin for 1 hour at 4°C. The binding of the primary antibody was revealed by incubation with Alexa fluor 488-conjugated secondary antibodies. Cells were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences).

### Lymphatic vessel tracing and analysis of lymphatic vessel function

The functionality of the lymphatic network in adult mice was investigated by noninvasive real-time fluorescence imaging of lymphatic function assessed after injection of hydrophobic cyanine dye-loaded nanoparticles (DiD-lipidots) of 50 nm diameter into the hind limb footpads of anesthetized adult mice. These neutral dye-loaded oily nanodroplets (with narrow size distribution) dispersed in aqueous buffer have been shown to display high brightness suitable for in vivo fluorescence imaging.<sup>19,20</sup> Moreover, because of their very small size (<100 nm) and their lipid nature, these particles are relevant not only for efficient lymphatic draining through lymph vessels, but also for their partial retention into lymph nodes.<sup>20-22</sup> DiD-lipidots' excitation and emission maxima were 646 and 668 nm, respectively. The DiD-lipidots' dispersion was prepared as previously described.<sup>19</sup> After injection of 5 µL of 10-µM dye, the mouse was placed inside a whole body in vivo imaging system (IVIS; Caliper Life Sciences). The uptake of DiD-lipidots by dermal lymphatic capillaries that feed lymphatic precollector and collector vessels was followed over a 15-minute period. Image acquisition and analysis were performed with Living Image 3 software (Caliper Life Sciences) using the cyanine5.5 fluorescence emission filter.

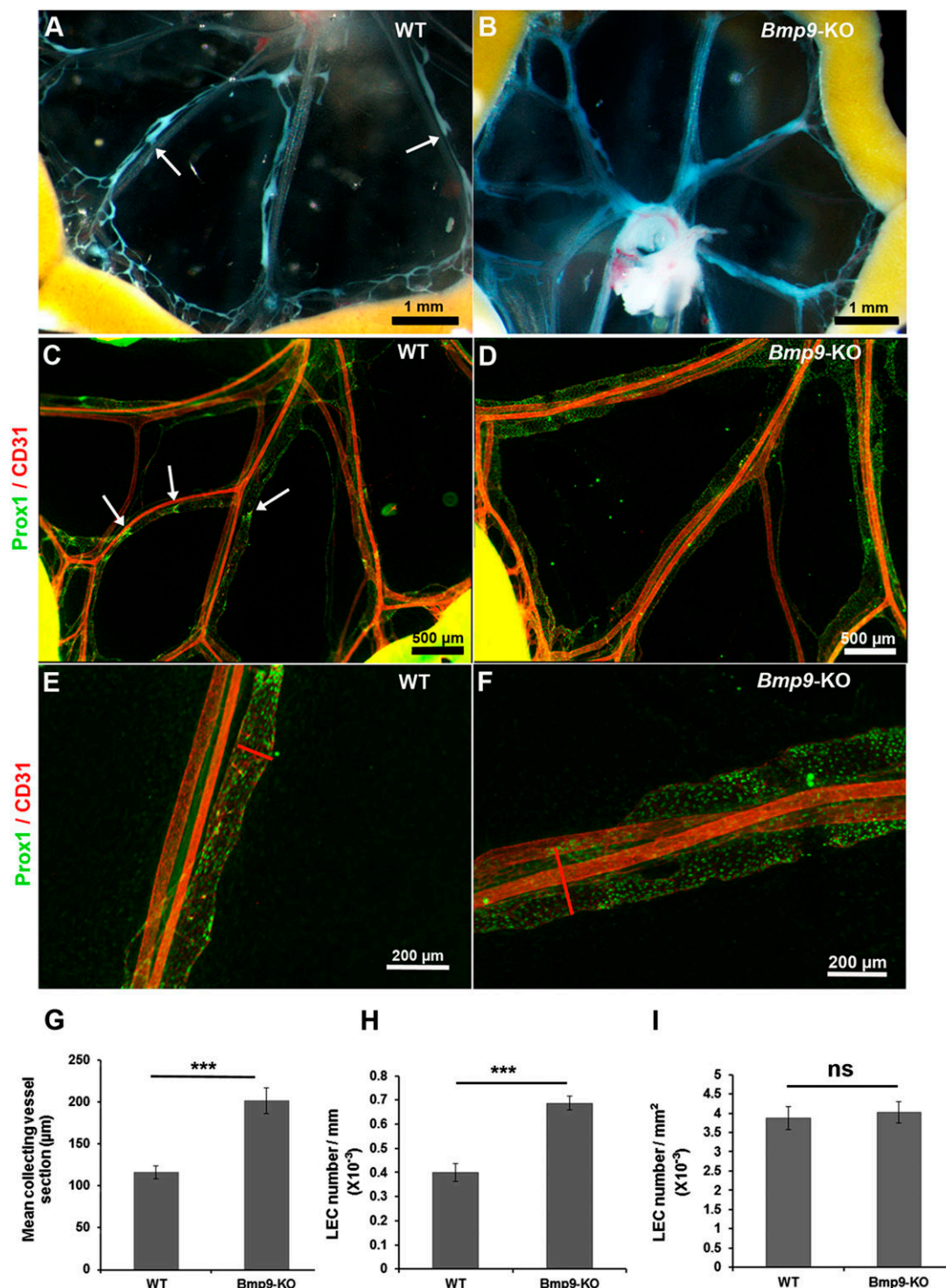
### Statistical analysis

Statistical data analysis was assessed using either unpaired Student *t* test or Mann-Whitney *U* test.

## Results

### *Bmp9* deficiency affects the development of lymphatic collecting vessels of the mesentery

To investigate a potential involvement of BMP9 during lymphatic collecting vessel maturation, we examined mesenteries of wild-type (WT) and *Bmp9*-KO mice at P0. The analysis of chyle-containing mesenteric collecting vessels in WT neonates revealed characteristic constrictions reflecting functional valves (Figure 1A). On the other hand, *Bmp9*-KO neonates displayed morphologically enlarged lymphatic vessels and the constrictions corresponding to valve territories were less visible (Figure 1B). Visualization of the lymphatic vessels by immunofluorescence staining of the nuclear transcription factor Prox1, which is restricted to the lymphatic vessels; the pan-endothelial marker CD31 confirmed these observations (Figure 1C-D). Several areas of dense Prox1-overexpressing cells, a typical feature



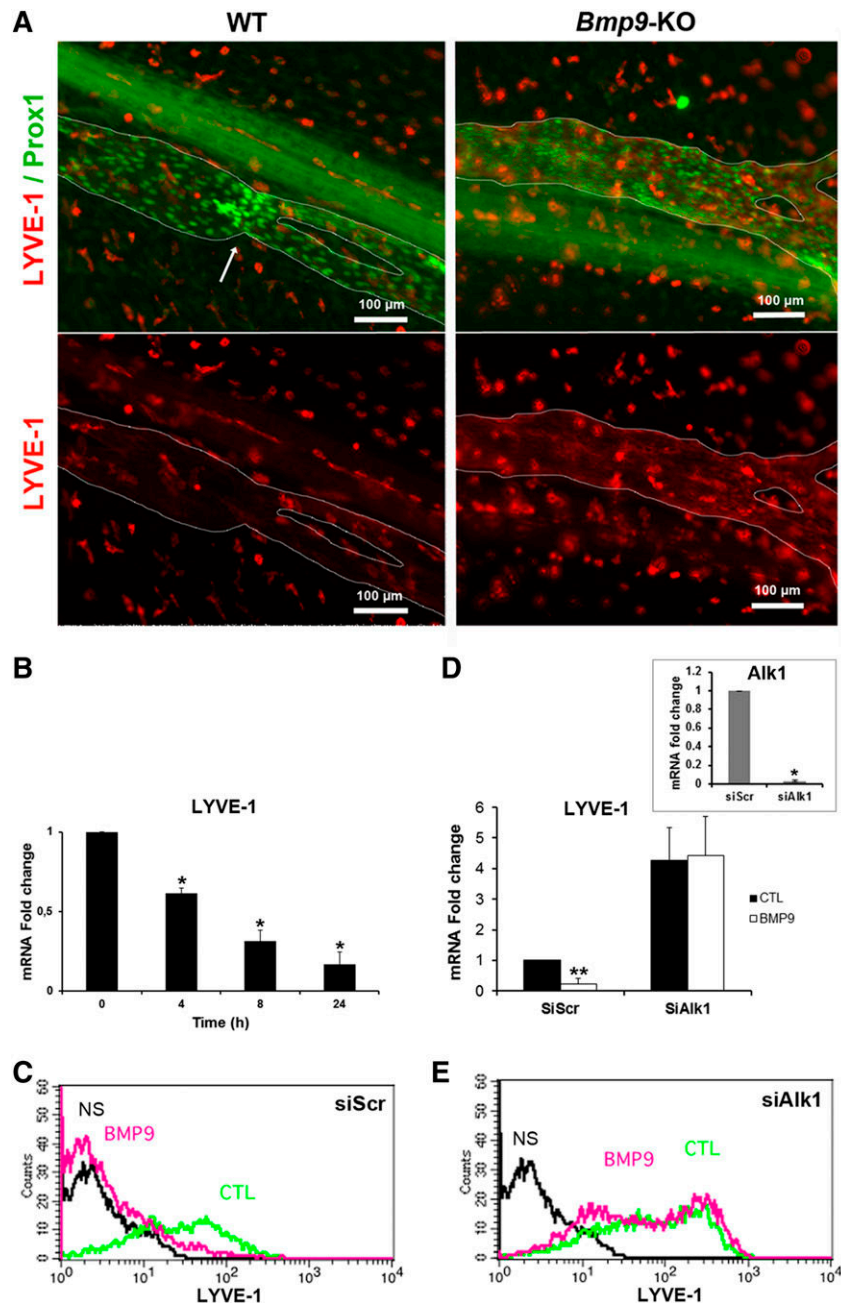
**Figure 1. Abnormal structure of lymphatic mesenteric collecting vessels in *Bmp9*-KO neonates at P0.** Representative macroscopic views of mesenteric vessels in WT (A) and *Bmp9*-KO (B) pups at P0. The lymphatic vessels are filled with white chyle and constrictions along the vessels reflecting the presence of valves are shown with white arrows. Whole-mount fluorescence immunostainings of WT (C) and *Bmp9*-KO (D) mesenteries with CD31 (red) and Prox1 (green); arrows point to Prox1-overexpressing cells in valve areas. Higher magnification views of the mid-part of mesenteric collecting vessels in WT (E) or *Bmp9*-KO (F). Enlarged vessels, as outlined by the red lines, showing vessel sections are observed in mutants. (G) Quantification of the mean collecting vessel section in WT and *Bmp9*-KO pups. The mean diameter of mesenteric lymphatic collecting vessels was calculated as the average of 4 different measurements performed using Axiovision 4.8 software throughout the length of 4 different collecting vessels per mesentery. (H-I) Quantification of LEC number per millimeter of collecting vessel length and by square millimeter of collecting vessel surface unit in WT and *Bmp9*-KO pups. Prox1-positive nuclei were counted per vessel unit length and per vessel surface unit on at least 3 collecting vessel per mesentery using Axiovision 4.8 software. Values are the mean ( $\pm$  SE) from 8 individuals per genotype. ns, not significant; \*\*\* $P \leq .001$ , significantly different from WT pups by unpaired Student *t* test.

of lymphatic valves, were observed in the mesentery of WT pups but were missing in *Bmp9*-KO pups. Higher magnification views of the mid-part of representative collecting vessels confirmed lymphatic

enlargement in *Bmp9*-KO neonates (Figure 1E-F). Quantitative analysis of the mean section of lymphatic collecting vessels confirmed the enlarged phenotype of these vessels in *Bmp9*-KO as compared



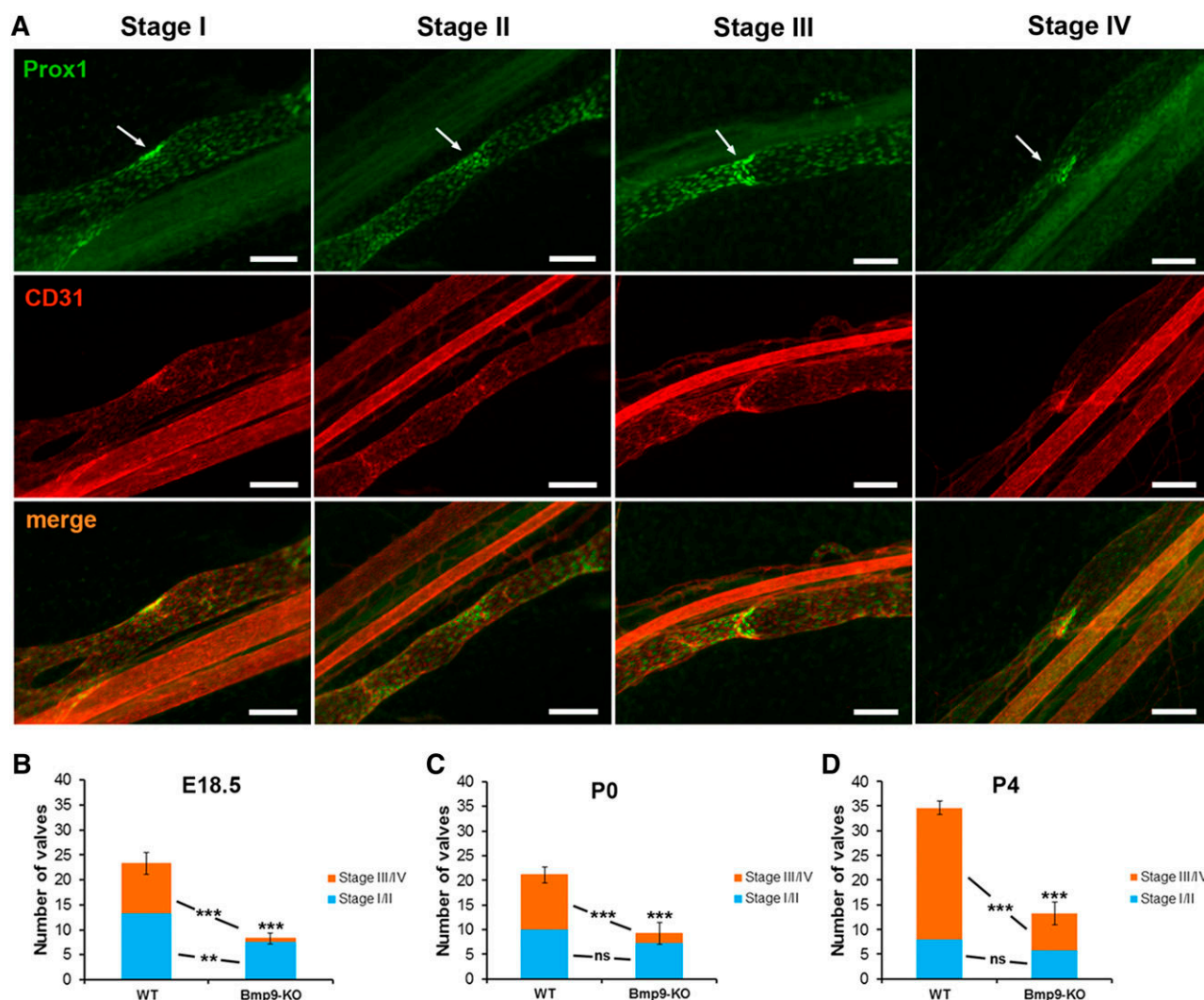
**Figure 2. LYVE-1 expression is regulated by BMP9 both in vivo in lymphatic collecting vessels of the mesentery and in vitro in cultured LECs.** (A) P0 lymphatic mesenteric collecting vessels were stained for LYVE-1 (red) and Prox1 (green). The dashed lines delineate the lymphatic vessels. Arrow indicates a valve. A nonlymphatic LYVE-1 immunoreactivity is also observed in isolated cells outside vessels, which probably correspond to macrophages. (B) Time-dependent inhibition of LYVE-1 mRNA expression in LECs treated with BMP9 (10 ng/mL); the results are presented as mRNA fold changes measured in BMP9-treated cells vs nontreated cells at each time point. Data are the mean  $\pm$  SE from 6 independent experiments performed in duplicate. \* $P \leq .05$ , significantly different from cytotoxic T lymphocyte (CTL) by Mann-Whitney  $U$  test. (C,E) Flow cytometry detection of LYVE-1 protein expression in LECs transfected for 24 hours with scramble siRNA or siRNA targeting Alk1 and then stimulated with (pink) or without (green) 10 ng/mL BMP9 for 48 hours. NS corresponds to fluorescence-activated cell sorter analysis in absence of antibodies (black). (D) LYVE-1 mRNA expression in LECs transfected for 24 hours with scrambled siRNA (siScr) or siRNA targeting Alk1 and then stimulated with or without 10 ng/mL BMP9 for 24 hours; data represent mean  $\pm$  SE ( $n = 6$ ). \*\* $P \leq .01$ , significantly different from CTL by Mann-Whitney  $U$  test. Inset shows Alk1 mRNA downregulation by siAlk1 (mean  $\pm$  SE,  $n = 4$ ). \* $P \leq .05$ , significantly different from siCTL by Mann-Whitney  $U$  test.



with WT pups (Figure 1G). Interestingly, the number of LECs (identified as Prox1-positive cells) per collecting vessel unit length was significantly higher in *Bmp9*-KO than in WT, whereas the number of LECs per surface unit was not different, indicating that this enlargement resulted from cellular hyperplasia rather than cellular hypertrophy (Figure 1H-I). Lymphatic capillaries (identified by lymphatic-specific hyaluronan receptor LYVE-1-positive staining) of the ventral skin of P0 neonates were also found enlarged, with some areas of hyperdilated and sac-like disorganized lymphatic vessels in *Bmp9*-KO as compared with WT newborns (supplemental Figure 1, left panel). On the other hand, the sprouting of lymphatic capillaries from the dorsal skin at E15.5 was not significantly different in *Bmp9*-KO as compared with WT mice (supplemental Figure 1, right panel). Interestingly, the blood vasculature of P0 *Bmp9*-KO neonates (ventral skin) was not affected (supplemental Figure 2).

### BMP9 regulates LYVE-1 expression

A loss of LYVE-1 expression is observed during the maturation of collecting vessels.<sup>5,6</sup> Therefore, to explore whether the enlarged collecting vessels observed in *Bmp9*-KO pups could be due to abnormal maturation, P0 mesenteric collecting vessels were stained with LYVE-1 and Prox1. LYVE-1 expression was very low in WT-collecting vessels at P0. In contrast, there was still a detectable LYVE-1 immunoreactivity in *Bmp9*-KO pups, suggesting an impairment of lymphatic collecting vessel maturation in the absence of BMP9 (Figure 2A). We also found that recombinant BMP9 inhibited LYVE-1 expression in primary cultures of LECs at both its mRNA and protein levels (Figure 2B-C). We further demonstrated that this inhibition was mediated by ALK1 using an RNA interference strategy. When ALK1 was silenced, BMP9 was no longer able to downregulate LYVE-1 mRNA and protein expression in LECs (Figure 2D-E). Interestingly,



**Figure 3. Defective lymphatic valve formation in *Bmp9*-KO embryos and neonates.** (A) WT P0 lymphatic mesenteric collecting vessels were stained for Prox1 (green) and CD31 (red) to allow the discrimination between the different valve maturation stages; arrows point to the valve location; bars, 100  $\mu$ m. (B-D) Quantitative analysis of valve formation at E18.5, P0, and P4 in WT and *Bmp9*-KO mice. Values correspond to the number of valves counted on 4 collecting vessels per mesentery;  $n = 6$  (*Bmp9*-KO) or  $n = 7$  (WT) at E18.5;  $n = 8$  (*Bmp9*-KO) or  $n = 9$  (WT) at P0;  $n = 12$  (*Bmp9*-KO) or  $n = 11$  (WT) at P4. ns, not significant.  $**P \leq .01$ ,  $***P \leq .001$ , significantly different from WT pups by unpaired Student *t* test.

and consistent with the BMP9-induced LYVE-1 downregulation, Alk1 silencing resulted in an increase in LYVE-1 expression. Targeted knockdown of ALK1 mRNA expression was verified by quantitative RT-PCR (Figure 2D, inset).

#### BMP9 is required for lymphatic valve formation in mesenteric collecting vessels

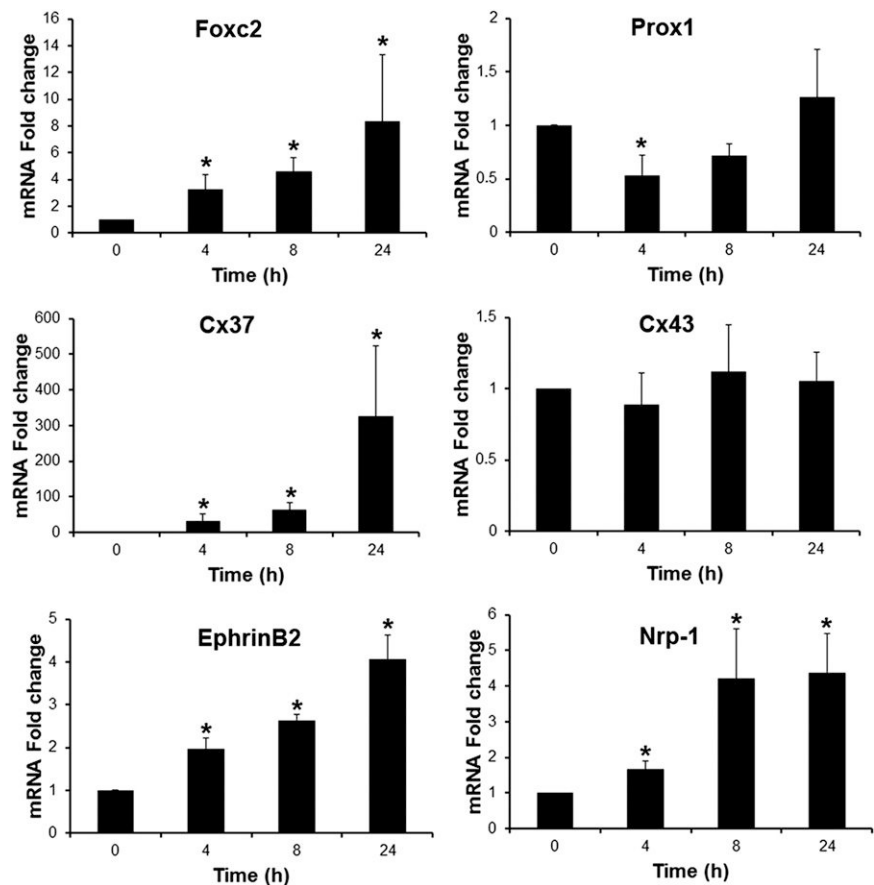
An important feature in lymphatic collecting vessel development and maturation is the formation of valves.<sup>23</sup> Four different stages of valve development have been previously defined.<sup>7,8</sup> Figure 3A illustrates these valve maturation stages on the basis of Prox1 and CD31 containing. Stage I is marked by the appearance of cell clusters expressing high levels of the transcription factor Prox1 at sites of developing valves. The establishment of the valve territory by coalescence of Prox1-overexpressing cells by a circularization process defines stage II. The formation of a ring-like constriction concomitant with the initiation of the formation of valve leaflets constitutes stage III, whereas stage IV is characterized by the elongation of valve leaflets into the lumen of the vessel and leads to

the formation of a mature V-shaped valve. We quantified mesenteric lymphatic valves in both WT and *Bmp9*-KO mice and classified them into 2 categories: immature (stage I/II) and mature (stage III/IV). We observed a significant reduction in the total number of valves in *Bmp9*-KO mutants at E18.5 as compared with WT (Figure 3B). This decrease was significant both in the number of immature and mature valves. A highly significant reduction in the total number of valves was also observed at P0 and P4 (Figure 3C-D). However, this difference was mainly due to a decrease in the number of mature valves. Still, the mature valves observed in P4 *Bmp9*-KO pups were correctly specified as assessed by the presence of the transcription factor Foxc2 and of the cell matrix adhesion receptor integrin  $\alpha 9$ <sup>23</sup> and by the absence of smooth muscle cell coverage of valve regions<sup>24</sup> (supplemental Figure 3).

#### BMP9 regulates the expression of several master genes known to be involved in valve formation

Several key molecular regulators associated with valve formation and their different stages of maturation have been identified.<sup>8,23</sup> We

**Figure 4.** BMP9-regulated genes, known to be involved in lymphatic valve development, in LECs. LECs were stimulated in serum-free medium in the absence or in the presence of 10 ng/mL BMP9 for the indicated times. Expression of HPRT was used to normalize the samples. The results are represented as mRNA fold changes measured in BMP9-treated cells vs nontreated cells at each time point. Data are the mean  $\pm$  SE from 4 independent experiments performed in duplicate. \* $P \leq .05$ , significantly different from respective controls by Mann-Whitney  $U$  test.



therefore analyzed whether these genes could constitute molecular targets for BMP9 in LECs by measuring their expression by quantitative real-time RT-PCR. BMP9 increased the mRNA levels of *Foxc2*, *Cx37*, *EphrinB2*, and *Nrp-1* in a time-dependent manner, whereas no significant variations were detected in *NFATc1*, *integrin $\alpha$ 9*, *Cx43*, and *Sema3a* levels (Figure 4 and data not shown). The *Foxc2* mRNA level was increased to eightfold 24 hours after BMP9 treatment, whereas *EphrinB2* and *Nrp-1* were increased around fourfold. The *Cx37* mRNA level was hardly detectable in LECs without BMP9 treatment and was very potently induced in response to BMP9 (more than 300-fold). As observed for LYVE-1 expression, BMP9 regulated the expression of these genes in an *Alk1*-dependent manner (data not shown). We also observed a small transient but significant inhibition in *Prox1* expression (50% reduction in mRNA level after 4 hours of BMP9 treatment).

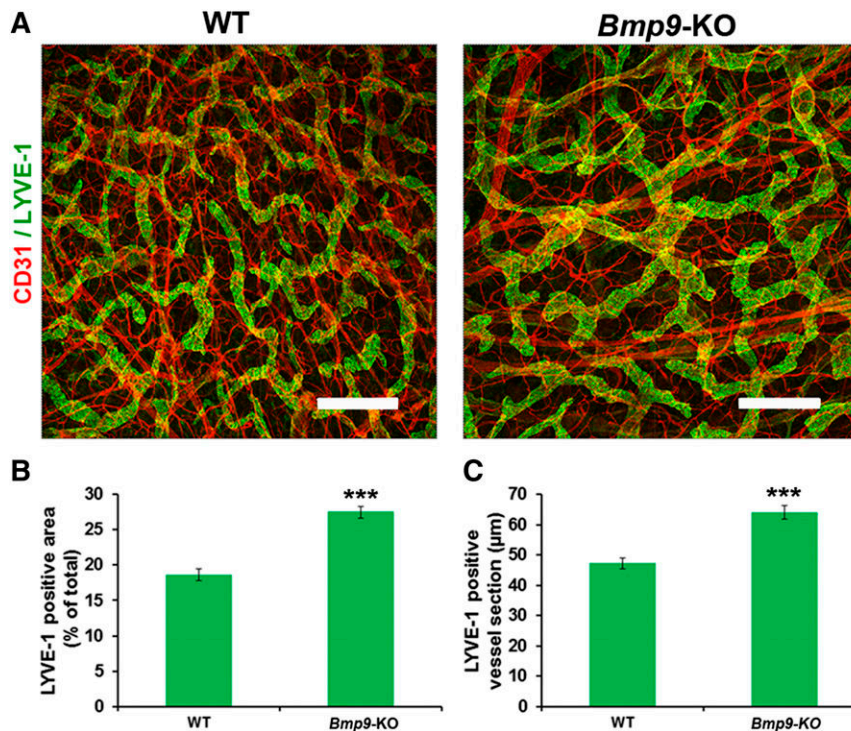
#### **BMP9 deficiency causes an abnormal lymphatic vasculature patterning and a decrease in lymphatic draining efficiency in adult mice**

We then investigated whether *Bmp9* deficiency also affects the growth and patterning of the lymphatic vessels in adult mice. Adult mouse ear skin vessels were stained with LYVE-1 and CD31. As shown in Figure 5A, the lymphatic capillary vessels formed a network of mostly small and often blind-end capillaries in WT mice, whereas enlarged or dilated cutaneous lymphatic vessels were seen in *Bmp9*-KO ears. Morphometric analyses confirmed that the average area of LYVE-1-positive cells and the mean section of LYVE-1-positive capillary vessels were significantly increased in *Bmp9*-KO mice vs WT (Figure 5B-C). Moreover, the defect in valve formation was not

restricted to the mesentery and still persisted in the adult, as assessed by the observation of a significant reduction in valve number in the diaphragm of adult *Bmp9*-KO mice (supplemental Figure 4). Similarly to our observations in neonates, no significant defects were observed in blood vessels (ear) in adult *Bmp9*-KO mice (supplemental Figure 2).

To investigate whether *Bmp9*-KO mice may have defects in their functional draining response, we performed a noninvasive real-time analysis of draining efficiency after injection of fluorescent nanoparticles (DiD-lipidots)<sup>19,20</sup> in the hind limb footpad of adult mice. We observed that in WT animals the dye was rapidly drained by lymphatic vessels and reached, as early as 3 minutes after injection, the popliteal lymph node (6 limbs over 9 tested, Figure 6A). In contrast, in *Bmp9*-KO mice, dye accumulation into the popliteal lymph node failed to be detected without skinning of the animals (6 limbs over 6 tested, Figure 6A). In *Bmp9*-KO mice, the uptake of the dye remained mostly diffuse in the limb and did not label the deep collectors as in WT mice (Figure 6A). Measurements of the kinetic of dye accumulation into the popliteal lymph node region revealed a significant difference between WT and *Bmp9*-KO mice from 7 minutes after injection (Figure 6B). These defects did not result from alteration in lymph nodes and/or collecting vessels structures as assessed by their apparent normal morphological features after Evans blue injection (supplemental Figure 5). The lymphatic function was also evaluated in P4 neonates 15 minutes after injection of fluorescein isothiocyanate-dextran into the hind limb footpad. After sacrifice and skin removal, we observed that the dye was drained into the collecting vessels leading to the popliteal lymph node in both WT and *Bmp9*-KO pups (supplemental Figure 6A-B). However, when examining the superficial lymphatic vascular network of the skin recovering these tissues, we observed that fluorescein isothiocyanate-dextran-labeled





**Figure 5. Abnormal patterning of ear lymphatic capillaries in adult *Bmp9-KO* mice.** (A) Adult ear lymphatic capillaries were stained for LYVE-1 (green) and CD31 (red). Note that the LYVE-1 staining overlays weak CD31 staining in the lymphatic vessels. Bar represents 300  $\mu$ m. (B) Quantification of the mean LYVE-1-positive area expressed as percentage of total area. The lymphatic vessel area in the inner layer of the ear of adult mice was measured using Image J software on images corresponding to 3 different fields of whole ear skin. These regions were kept constant for all samples. (C) Quantification of the mean LYVE-1-positive lymphatic vessel section expressed in micrometers. To quantify ear skin capillary mean lymphatic size, 5 horizontal lines were evenly laid on the images, and the diameters of lymphatic vessels that crossed these lines with an angle above 45° were measured using Image J according to Zhou et al.<sup>31</sup> Values are mean  $\pm$  SE; n = 8 for each genotype. \*\*\* $P \leq .001$ , significantly different from WT pups by unpaired Student *t* test.

vessels were rarely found in WT pups (supplemental Figure 6C,E), whereas in contrast a network of labeled capillaries was detected in most *Bmp9-KO* pups (supplemental Figure 6D,F) suggesting a less efficient draining capacity in these pups as in the adults. In addition, these vessels often exhibited enlarged areas that confirmed our previous observations performed in the ventral skin of P0 pups (supplemental Figure 1).

## Discussion

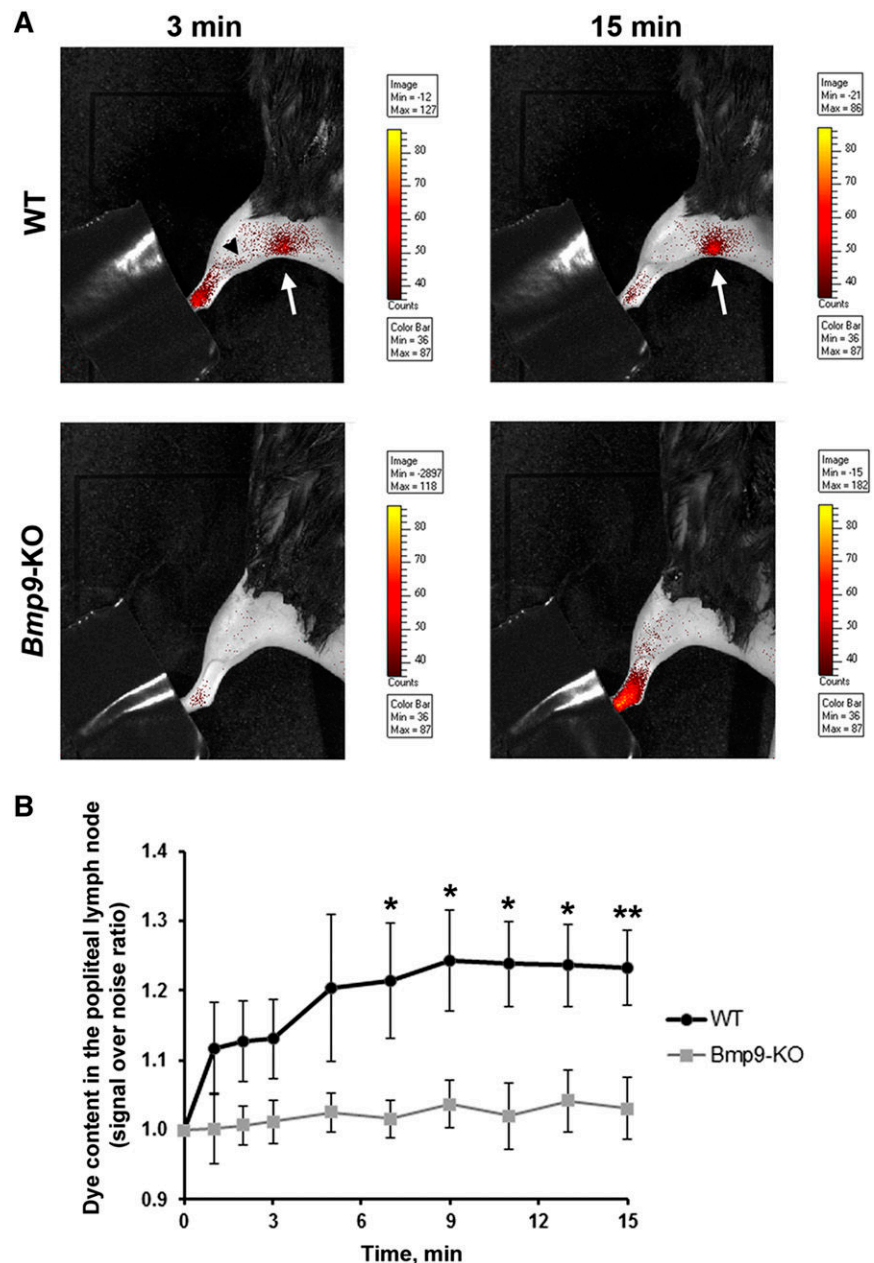
The lymphatic vasculature contains 2 distinct compartments: lymphatic capillaries, important for the uptake of interstitial fluid, and collecting vessels, which transport the lymph toward lymph nodes and back to the circulation. In the present work, we demonstrate that BMP9 is critical for the development of the lymphatic vasculature of these 2 compartments as well as for the formation of lymphatic valves.

The effect of BMP9 on the development of lymphatic capillaries in the skin is in agreement with the previous work published by Niessen et al, who demonstrated that adding the extracellular domain of ALK1, which traps ALK1 ligands at P1, P3, and P5 affected the honeycomb lymphatic vessel pattern of the mouse tail dermis.<sup>16</sup> In the present work, we show that BMP9 is the ALK1 ligand involved in vascular lymphatic capillary patterning. Indeed, we found that *Bmp9*-deficient mice exhibited enlarged lymphatic capillaries in the abdominal skin of neonates and in the ear of adult mice. In addition, our results also provide evidence for an important role of BMP9 on the maturation of large lymphatic-collecting vessels. Indeed, the mesenteric collecting vessels were enlarged, which could result from a hyperplasia because an increase in the number of lymphatic cells was observed. We also demonstrated that these enlarged vessels expressed a higher level of LYVE-1. In vitro, we could show that BMP9 downregulated LYVE-1 expression via ALK1. Although LYVE-1 is found absent in cells constituting

valves and downregulated in collecting vessels, the meaning of this phenomenon is unknown and remains to be elucidated.

The formation of intraluminal valves accompanies collecting vessel maturation and specification and is crucial to ensure proper unidirectional lymph flow in the lymphatic system. We report here that BMP9 controls this fundamental step. We found that *Bmp9-KO* embryos and pups presented a significant reduction in the total number of valves at E18.5, P0, and P4 and that this reduction is in a large part from a decrease in the number of mature valves vs immature valves, in particular at P0 and P4. This is in favor of a role for BMP9 both in the initiation of the process and in the maturation of these valves. Still, the few mature valves observed in *Bmp9-KO* pups did not show any major differences in their overall structure as revealed by Foxc2, integrin  $\alpha 9$ , and  $\alpha$ -SMA staining, suggesting that once the commitment in valve maturation is triggered, these valves correctly mature. We found that BMP9 significantly increased the expression of 2 master genes, Foxc2 and Cx37, involved in valve formation. The reduction in the total number of valves may result from a defect in the early initiation process driven by Foxc2 whereas the defect in valve maturation in *Bmp9-KO* mice may be the consequence of low Cx37 expression, which is involved in the assembly and delimitation of lymphatic valve territory.<sup>7,9</sup> We demonstrated that BMP9 regulates the expression of several important features of the process of lymphatic maturation and valvulogenesis, providing a molecular framework for a stepwise model of lymphatic vessel maturation and valve formation as described in Figure 7. BMP9 acting via ALK1 inhibits LYVE-1 expression, which is concomitant with lymphatic maturation. In parallel, BMP9 also induces the expression of Foxc2, Cx37, ephrinB2, and Nrp-1, which are all involved in valve formation. Interestingly, EphrinB2 has already been demonstrated to be a target of BMP9 in blood endothelial cells.<sup>25</sup> Flow has been demonstrated to induce Foxc2 expression and to act in concert with Prox1 to regulate early steps of lymphatic valve morphogenesis.<sup>7</sup> ALK1 expression has also been reported to be regulated by flow in zebrafish.<sup>26</sup> Therefore, we propose that flow

**Figure 6. Impairment of lymphatic drainage in adult *Bmp9*-KO mice.** (A) Representative fluorescence images of WT and *Bmp9*-KO hind limbs obtained 3 and 15 minutes after injection of DiI-lipidots. The extremity of the paw was hidden not to saturate the images by the fluorescence signal at the injection site. The black arrowhead outlines lymphatic collectors; the white arrow indicates the popliteal lymph node. The values of the scale bars for fluorescence intensity were adjusted to normalize each image series at comparable values. (B) Quantitative analysis of dye accumulation into the popliteal lymph node. Signal over noise ratio was measured. Values are means  $\pm$  SE;  $n = 6$  (*Bmp9*-KO) or  $n = 9$  (WT). \* $P \leq .05$ , significantly different by Mann-Whitney  $U$  statistical test.

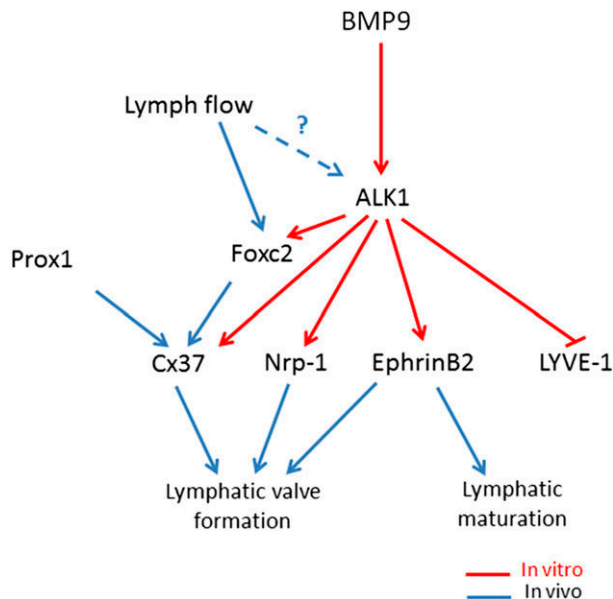


could increase ALK1 expression, which would raise BMP9 signaling to favor the downstream cascade of lymphatic vessel development. Although *Prox1* has been established to be the master regulator of LEC fate, its function in lymphatic valves is not completely understood. Accordingly, we observed that BMP9 only induces a slight and transient inhibition in *Prox1* mRNA level in LECs. These data suggest that *Prox1* may not be the main target involved in BMP9-mediated valve formation.

The BMP9/ALK1 signaling pathway has been largely demonstrated to be involved in the regulation of angiogenesis.<sup>27,28</sup> It has been established that this pathway is an important regulator of postnatal neovascularization of the mouse retina.<sup>15,29</sup> In previous work, we found that *Bmp9* deficiency did not alter postnatal blood vascularization, whereas addition of a neutralizing anti-BMP10 antibody in these pups had a dramatic effect on this vascularization, demonstrating that BMP10 could compensate for the loss of

BMP9 in retinal angiogenesis.<sup>15</sup> In accordance with these data, we did not observe any defects in blood vessels of the ventral skin nor in the ear in *Bmp9*-KO mice. In contrast, we show here that *Bmp9* deficiency is sufficient to affect lymphatic development, and thus that BMP10 cannot compensate BMP9 deficiency for lymphatic development. This does not seem to be the result of the involvement of distinct downstream signaling mechanisms for BMP9 and BMP10, because we found that BMP9-regulated genes in LECs are also targets for BMP10 (data not shown). Another possible explanation may be that active BMP10 might not be accessible to lymphatic vessels. BMPs are required to be locally activated by proteases of the furin/subtilisin proprotein convertase family.<sup>30</sup> We could suppose that the activation machinery for BMP10 might not be present within the lymphatic vessel environment.

Importantly, we established here that *Bmp9* deficiency has a functional consequence in the draining efficiency of the lymphatic



**Figure 7. Working model for BMP9 regulation of lymphatic vessel maturation and valve development.** In LECs, BMP9 acting via ALK1 inhibits LYVE-1 expression. In parallel, BMP9 also via ALK1, induces the expression of Foxc2, Cx37, ephrinB2, and Nrp-1, which have all been involved in lymphatic valve formation. Flow has been demonstrated to induce Foxc2 expression and to act in concert with Prox1 to regulate early steps of lymphatic valve morphogenesis.<sup>7</sup> ALK1 expression has been reported to be regulated by flow in zebrafish.<sup>26</sup> Therefore, we propose that flow could increase ALK1 expression, which would raise BMP9 signaling to favor the downstream cascade of lymphatic vessel development.

system in both neonates and adult mice. Although we could demonstrate a significant reduction in the draining efficiency, the lymphatic system remained functional. This is consistent with the fact that these mice do not apparently suffer from edema. Therefore, our results would suggest that BMP9 is not fundamental for lymphatic function under normal physiological situations but that the defects observed in these *Bmp9*-KO mice may have important consequences under conditions in which a more active drainage is necessary. Whether the alteration of BMP9 signaling in mice and in human patients may contribute to lymphedema formation or to metastatic dissemination is now an important question to solve.

In conclusion, our study sheds light on early steps of lymphatic maturation and valve formation, and suggests an important contribution of the growth factor BMP9 in this remodeling process. To

our knowledge, this work is the first description of a circulating factor, which could regulate lymphatic valves formation and maturation.

## Acknowledgments

The authors thank Dr Amélie Sabine for sharing her expertise and protocols for mouse tissue dissection and whole mount immunostaining; Dr Jean-Luc Coll and the Plateforme d'imagerie optique du petit animal of INSERM U823 (Institut Albert Bonniot, Grenoble, France) for the access to their microscope; and Mariela Subileau, Stéphane Hasse, and Pierre Simonet for technical help and the animal care staff of iRTSV for their help in animal husbandry.

This work was supported by INSERM (U1036), Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant/laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection et Département des micro-Technologies pour la Biologie et la Santé/Laboratoire d'Electronique de Technologie de l'Information), Université Joseph Fourier, Association pour la Recherche sur le Cancer (postdoctoral grant to G.M. and grant SFI20111203720), the Groupement d'Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer Dauphiné-Savoie, the Comité Départemental de la Loire et de l'Isère de la Ligue contre le cancer, Association Malades du Rendu-Osler, and the Fondation Lefoulon-Delalande (postdoctoral grant to D.C.). Work in S.-J. Lee's laboratory was supported by National Institutes of Health grant HD35887/AR060636.

## Authorship

Contribution: S.L., D.C., G.M., and D.V. performed research; C.M. performed genotyping experiments; T.Z. and S.-J.L. generated the *Bmp9*-KO mice; F.P.N. and I.T. generated DiD-lipidots; J.-J.F., S.B., and D.V. designed research; S.L., D.C., J.-J.F., S.B., and D.V. discussed the results; D.V. and S.B. wrote the manuscript with the help of S.L., D.C., and J.-J.F.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Daniel Vittet, INSERM U1036, 17 rue des Martyrs, CEA Grenoble, 38054 Grenoble cedex 9, France; e-mail: daniel.vittet@cea.fr.

## References

- Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise. *Cell*. 2010;140(4):460-476.
- Rockson SG. Diagnosis and management of lymphatic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(10):799-806.
- Norrmén C, Tammela T, Petrova TV, Alitalo K. Biological basis of therapeutic lymphangiogenesis. *Circulation*. 2011;123(12):1335-1351.
- Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, et al. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vasculature failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*. 2004;10(9):974-981.
- Mäkinen T, Adams RH, Bailey J, et al. PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev*. 2005;19(3):397-410.
- Norrmén C, Ivanov KI, Cheng J, et al. FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. *J Cell Biol*. 2009;185(3):439-457.
- Sabine A, Agalarov Y, Maby-El Hajjami H, et al. Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. *Dev Cell*. 2012;22(2):430-445.
- Bazigou E, Makinen T. Flow control in our vessels: vascular valves make sure there is no way back. *Cell Mol Life Sci*. 2012;70(6):1055-1066.
- Kanady JD, Dellinger MT, Munger SJ, Witte MH, Simon AM. Connexin37 and Connexin43 deficiencies in mice disrupt lymphatic valve development and result in lymphatic disorders including lymphedema and chylothorax. *Dev Biol*. 2011;354(2):253-266.
- Bazigou E, Xie S, Chen C, et al. Integrin-alpha9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Dev Cell*. 2009;17(2):175-186.
- Juriscic G, Maby-El Hajjami H, Karaman S, et al. An unexpected role of semaphorin3a-neuropilin-1 signaling in lymphatic vessel maturation and valve formation. *Circ Res*. 2012;111(4):426-436.
- Bouvrée K, Brunet I, Del Toro R, et al. Semaphorin3A, Neuropilin-1, and PlexinA1 are required for lymphatic valve formation. *Circ Res*. 2012;111(4):437-445.
- Roelen BA, van Rooijen MA, Mummery CL. Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn*. 1997;209(4):418-430.

14. David L, Mallet C, Keramidas M, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*. 2008;102(8):914-922.
15. Ricard N, Ciais D, Levet S, et al. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*. 2012;119(25):6162-6171.
16. Niessen K, Zhang G, Ridgway JB, Chen H, Yan M. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood*. 2010;115(8):1654-1661.
17. Bidart M, Ricard N, Levet S, et al. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(2):313-324.
18. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, et al. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood*. 2005;105(12):4642-4648.
19. Gravier J, Navarro FP, Delmas T, et al. Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt*. 2011;16(9):096013.
20. Navarro FP, Berger M, Guillermet S, et al. Lipid nanoparticle vectorization of indocyanine green improves fluorescence imaging for tumor diagnosis and lymph node resection. *J Biomed Nanotechnol*. 2012;8(5):730-741.
21. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol*. 2007;25(10):1159-1164.
22. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):787-796.
23. Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*. 2011;193(4):607-618.
24. Lutter S, Xie S, Tatin F, Makinen T. Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. *J Cell Biol*. 2012;197(6):837-849.
25. Kim JH, Peacock MR, George SC, Hughes CC. BMP9 induces EphrinB2 expression in endothelial cells through an Alk1-BMPRII/ActRII-ID1/ID3-dependent pathway: implications for hereditary hemorrhagic telangiectasia type II. *Angiogenesis*. 2012;15(3):497-509.
26. Corti P, Young S, Chen CY, et al. Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. *Development*. 2011;138(8):1573-1582.
27. David L, Feige JJ, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(3):203-212.
28. Cunha SI, Pietras K. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood*. 2011;117(26):6999-7006.
29. Larrivée B, Prahst C, Gordon E, et al. ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell*. 2012;22(3):489-500.
30. Sengle G, Ono RN, Sasaki T, Sakai LY. Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5087-5099.
31. Zhou F, Chang Z, Zhang L, et al. Akt/Protein kinase B is required for lymphatic network formation, remodeling, and valve development. *Am J Pathol*. 2010;177(4):2124-2133.

## Supplemental Information

### Supplemental Methods.

#### ***Primary antibodies.***

Primary antibodies used for immunostainings were as follow: Sheep anti-mouse FOXC2 (AF6989, R&D Systems), Goat anti-mouse Integrin  $\alpha$ 9 (AF3827, R&D Systems), Goat anti-mouse LYVE-1 (AF2125, R&D Systems), Rat anti-mouse LYVE-1 (MAB2125, R&D Systems), Goat anti-human Prox1 (AF2727, R&D Systems), Rat anti-mouse CD31 (MEC13.3, Pharmingen BD Biosciences), mouse anti-mouse  $\alpha$  Smooth muscle actin (M0851, clone 1A4, DAKO).

### Legends of supplemental figures.

**Figure S1: Analysis of lymphatic capillary vessel patterning in the skin of E15.5 embryos and P0 neonates.** Left panels: LYVE-1 whole mount immunostainings of ventral skin of P0 neonates. Representative images of P0 ventral skin lymphatic capillaries are shown. Quantification of the mean LYVE-1-positive area is expressed as percentage of the total area measured using Image J software. Values are the mean  $\pm$  SE;  $n = 7$  (*Bmp9*-KO) or  $n = 8$  (WT).  $**P \leq 0.01$ , significantly different from WT pups by unpaired Student' *t* test. Right panels: LYVE-1 whole mount immunostainings of dorsal skin of E15.5 embryos. Representative images of skin along the dorsal midline are shown. Quantification of sprouting was performed by counting the number of tips per surface area kept constant in all images and placed along the lymphatic front migration. Values are mean  $\pm$  SE;  $n = 9$  (*Bmp9*-KO) or  $n = 5$  (WT). ns, not significant by unpaired Student' *t* test.

### **Figure S2: Absence of blood vessel abnormalities in *Bmp9*-KO mice.**

Representative images of CD31 whole mount immunostainings of P0 neonate ventral skin and of adult ear skin for both WT and *Bmp9*-KO mutants are illustrated. In both cases, the mean CD31-positive area was measured using Image J software on at least 3 randomly selected fields. Data are the mean  $\pm$  SE;  $n = 3$  for each genotype at P0;  $n = 9$  (*Bmp9*-KO) or  $n = 7$  (WT) for adult ear skin. ns; not significant by unpaired Student' *t* test.



**Figure S3: Analysis of valve stage III/IV integrity in P4 *Bmp9*-KO neonates.**

Lymphatic mesenteric collecting vessels from P4 WT or *Bmp9*-KO neonates were immunostained for FOXC2 (green) and CD31 (red), Integrin  $\alpha 9$  (green) and CD31 (red), or Prox1 (green) and  $\alpha$ SMA (red). Representative images of valves at stage III/IV are illustrated. The arrows point to the valves.

**Figure S4: Defective lymphatic valve formation in the diaphragm of adult *Bmp9*-KO mice.**

A, B and C; Representatives images of CD31 and Prox1 whole mount immunostainings of a lymphatic valve in the diaphragm of a WT mouse. The arrowhead points to the valve location. D and E; visualization of lymphatic valves after CD31 whole mount immunostaining. Representative images of lymphatics in the tendinous region of the diaphragm of WT and *BMP9*-KO deficient mice are shown. The arrows point to valves. Note the presence of enlarged vessels in the *Bmp9*-KO mutant. F; Quantification of valve number per unit of lymphatic vessel length. Counts were performed on the entire lymphatic vessel network of the tendinous region of the diaphragm. Values are mean  $\pm$  SE; n = 5 for each genotype. \*\*\* $P \leq 0.001$ , significantly different from WT by unpaired Student' *t* test.

**Figure S5: Evans blue labeling of lymph nodes (LN) and of the hindlimb lymphatic collecting vessels in WT and *Bmp9*-KO adult mice.**

A, B; The popliteal LN (white arrow) is labeled after left hindfoot injection (blue arrow) of 3  $\mu$ l 3% Evans Blue. Note the diffusion of the dye in the remaining skin of the limb in the *Bmp9*-KO mutant, reflecting a poor draining efficiency. C, D; High magnification of the popliteal region of a right hindlimb showing dye labeling of the popliteal LN (white arrow) and of the afferent lymphatic collecting vessels (white arrowheads). E, F; Inguinal LNs (left flank) are labeled after injection of 5  $\mu$ l 3% Evans Blue dye into the lateral tail base. The asterisk points to the inguinal LN and the black arrow indicates the efferent lymphatic vessel that drains to the axillary LN. Note the stronger labeling in the WT compared to the *Bmp9*-KO mutant. In all experiments, mice were sacrificed 20 min after Evans Blue injection.

**Figure S6: Distribution of FITC-Dextran after injection into the hind limb footpads of WT and *Bmp9*-KO neonates.**

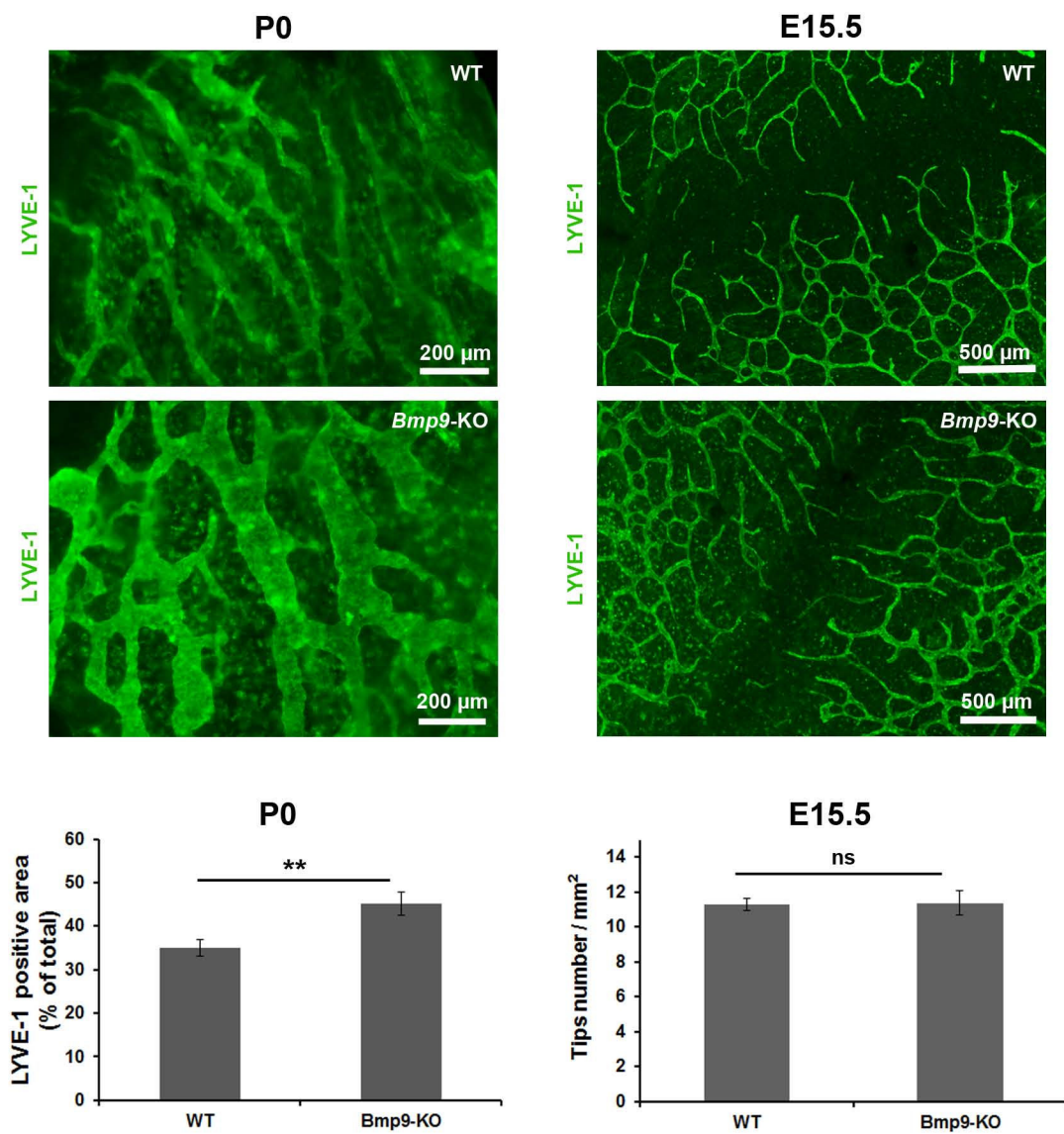
1.5  $\mu$ L of 5 mg/mL FITC-Dextran (MW: 2000 kDa, Sigma) diluted in PBS were injected into the hind limb footpads of anaesthetized P4 or P5 neonates. After 15 min, the pups were sacrificed by decapitation and the skin overlaying the limb was carefully removed by dissection and layered out. The lymphatic vessel networks of both the skinned limbs and the removed skin were imaged with a fluorescence macroscope (LEICA CLS 150X) equipped with an ORCA C9100 camera (Hamamatsu). Image analysis was performed with Wasabi 1.5 software (Hamamatsu).

A and B, Visualization of the deep collecting lymphatic vessels of the calf (arrows) and of the popliteal lymph node (yellow asterisk). C and D, Distribution of the dye in the superficial dermal lymphatic capillary network of the calf skin. E and F, High magnification of the central areas of images C and D (box).



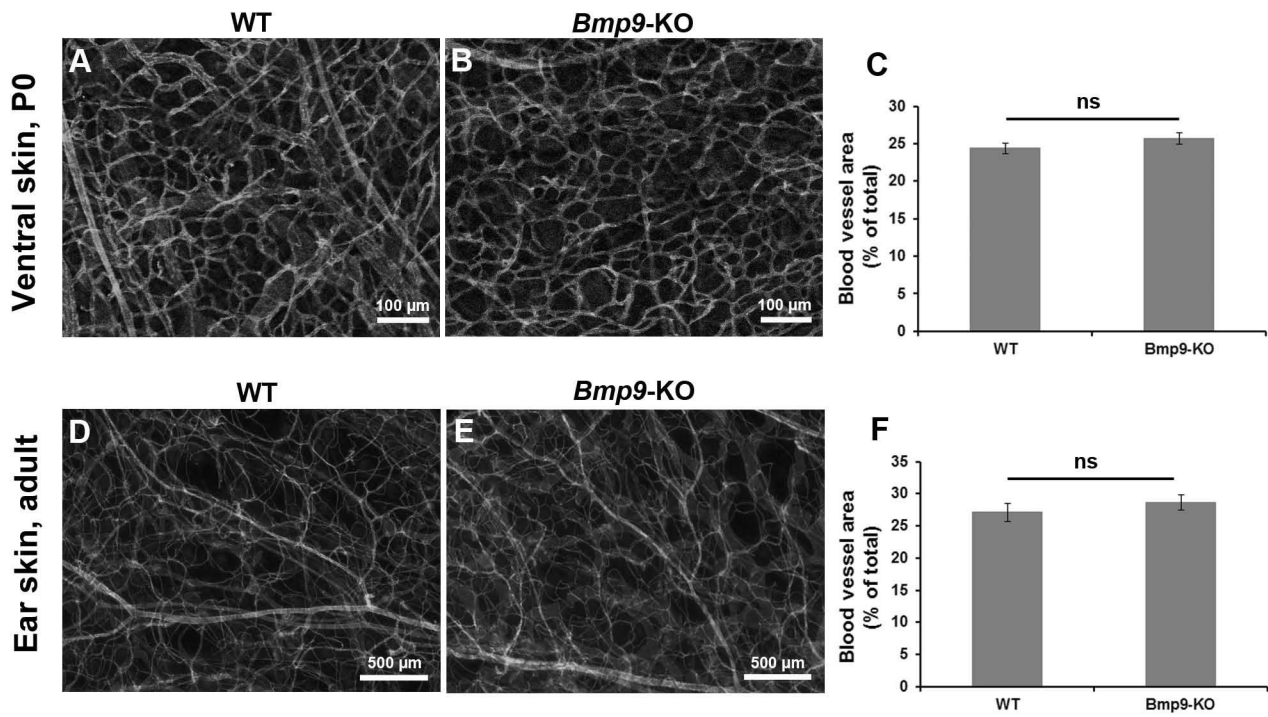
**Supplemental Table 1: PCR Primer sets used for gene expression analysis.**

Gene	Upstream primer	Downstream primer
LYVE-1	5'- AACAAATAGGCTGCAAACTGTCGGC -3'	5'- AAACCTGCAGCTATGGCTGGGTTG -3'
Prox1	5'- TTGCCGGCTTAAGAGGGCTGTG -3'	5'- GCGCTCCGCTCCTCCCAGTT-3'
Foxc2	5'- CGGCTTCACCAGGTCCTTAG -3'	5'- GAGCCGTCTCGGAAGCAG -3'
Connexin37	5'- GGTCCAGCAACTTCTCCAGG -3'	5'- CATCGTCCCCACCTCCAC-3'
Neuropilin-1	5'- AAATGGCGCCCTGTGTCCCG -3'	5'- CAGAGCGCTCCCGCCTGAAC-3'
EphrinB2	5'- TCCAGGCCCTCCAAAGACCCA -3'	5'- CCCTCTCCTCAACTGTGCCAAACC -3'
Connexin43	5'- ACTTGCGGTGACTTCACTACT-3'	5'- CCAGCAGTTGAGTAGGCTTGA -3'
Semaphorin3a	5'- ATTTTGAAAACGGCCGTGGG-3'	5'- GTGCCCAAGAGTTCGGAAGA -3'
NFATc1	5'- GTCCTGGAGATCCCACTCCT -3'	5'- GTTCTTCCTCCCGATGTCCG -3'
Integrin $\alpha$ 9	5'- GAGATGCACCGAACTGGACA -3'	5'- ATCCACTCATCATCGCGGTC -3'
HPRT	5'- GCTGGTGAAAAGGACCTCT -3'	5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3'

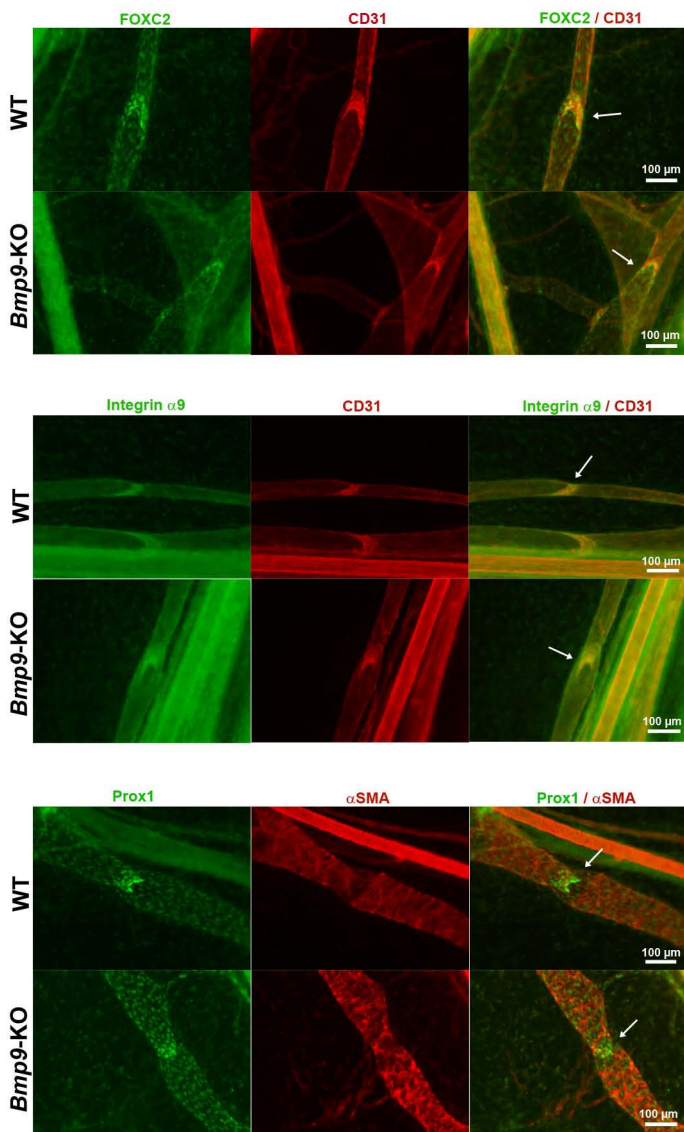


**Figure S1**

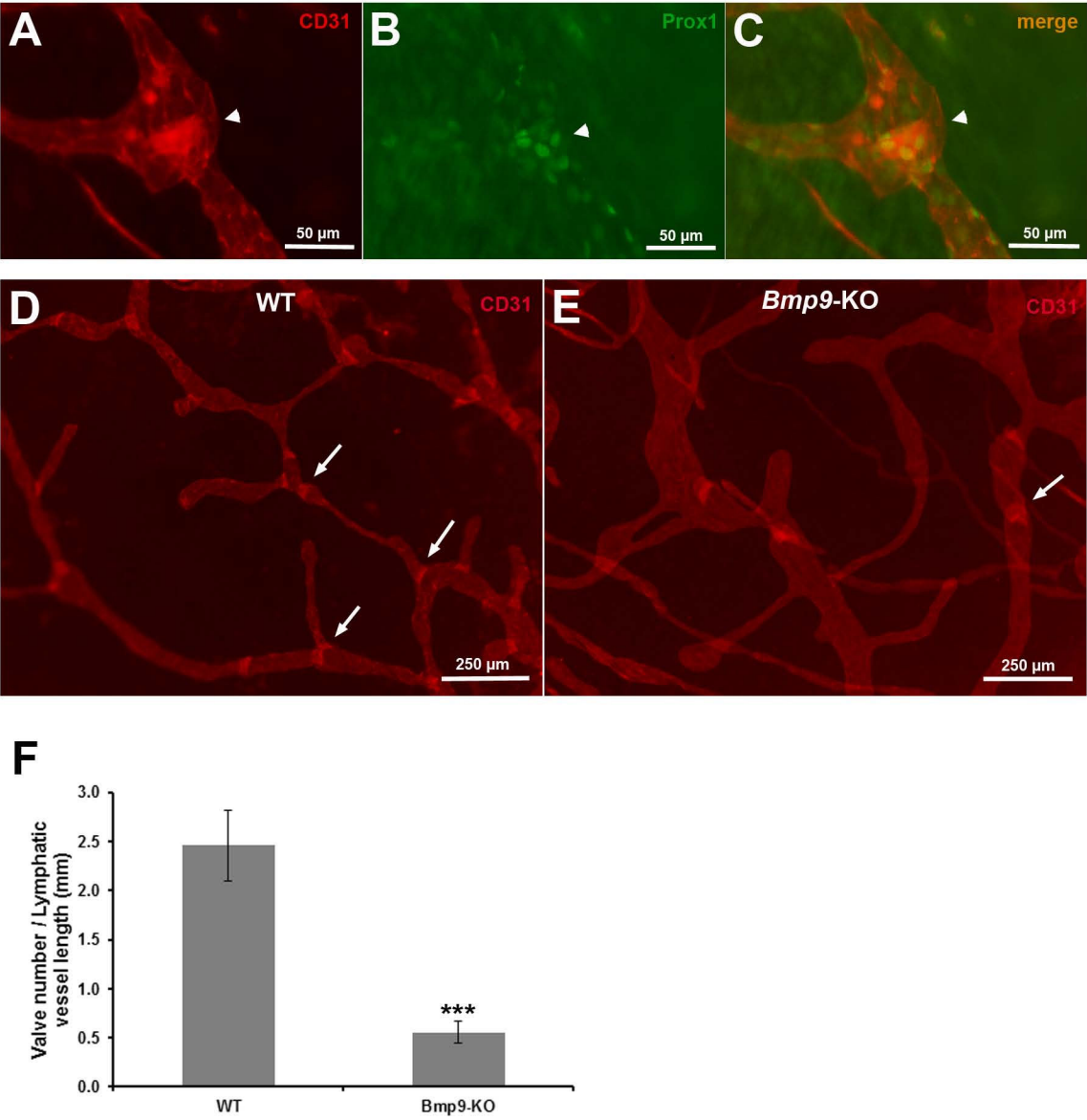
(Levet et al.)



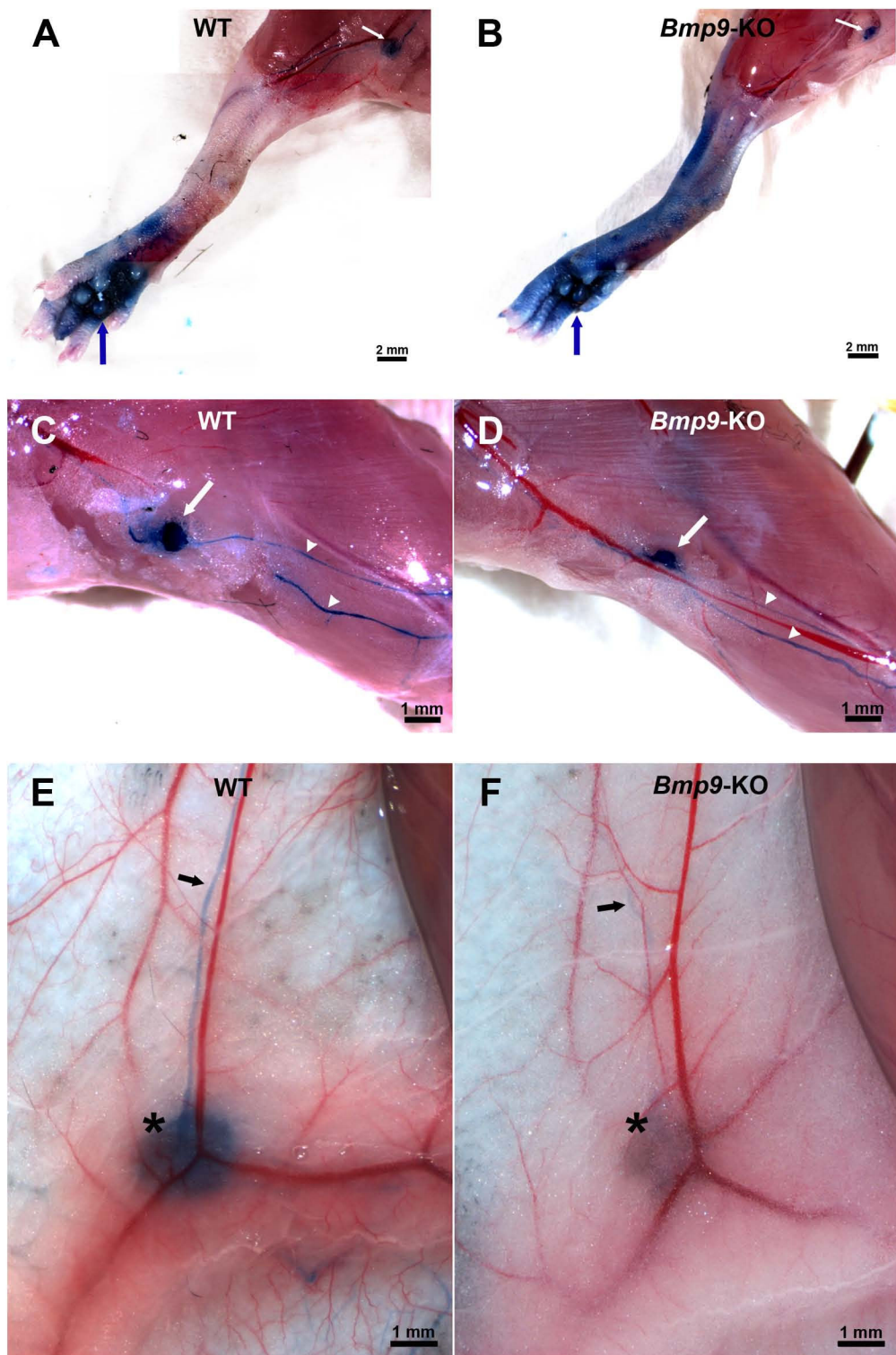
**Figure S2**  
(Levet et al.)



**Figure S3**  
(Levet et al.)

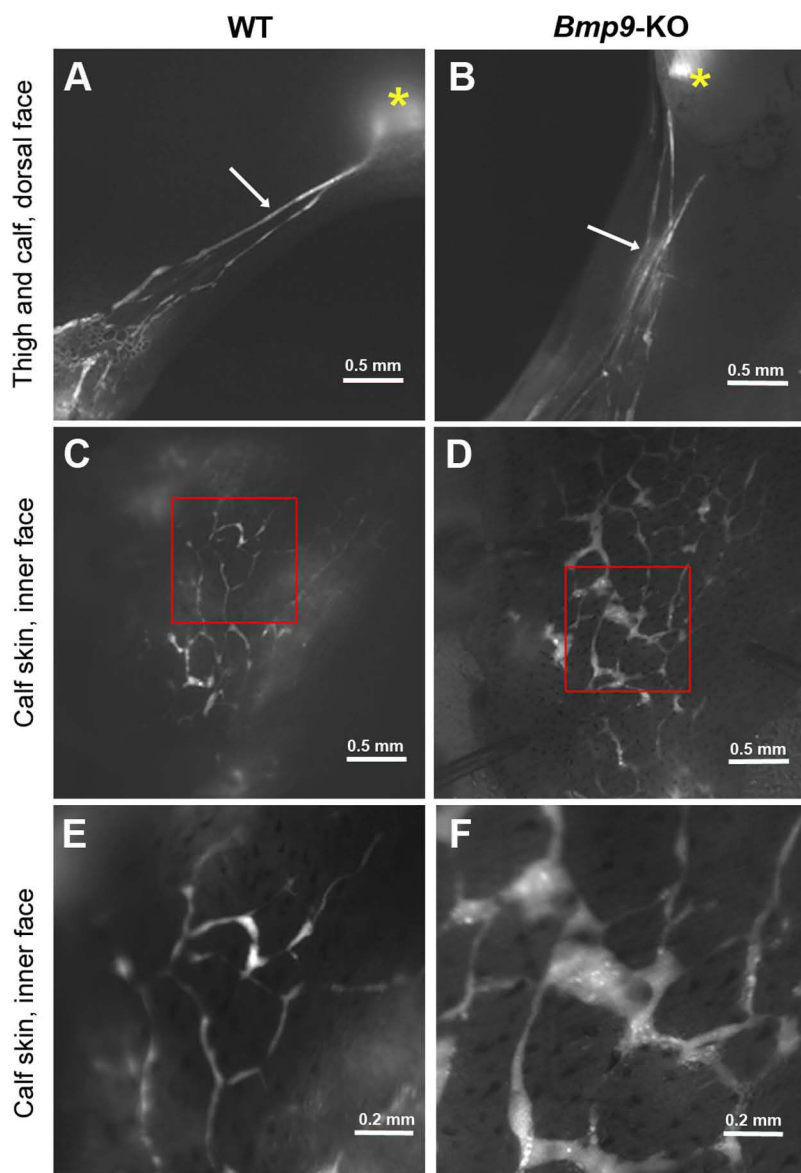


**Figure S4**  
(Levet et al.)



**Figure S5**  
(Levet et al.)





**Figure S6**  
(Levet et al.)



### 3. Bref résumé de l'article

- 1) L'utilisation des souris *Bmp9*-KO a permis de mettre en évidence un rôle crucial de BMP9 dans la maturation des collecteurs lymphatiques du mésentère de souriceaux nouveau-nés. Ces vaisseaux sont élargis, hyperplasiques et maintiennent l'expression de l'antigène LYVE-1 dont l'expression est normalement réprimée dans les collecteurs lymphatiques. Les capillaires des souris *Bmp9*-KO sont également anormalement larges.
- 2) Par ailleurs, l'implication BMP9 dans la formation et la maturation des valves lymphatiques présentes dans ces vaisseaux a été démontrée. Chez les souriceaux *Bmp9*-KO, on observe une réduction du nombre de valves et de leur degré de maturation.
- 3) En parallèle des défauts structuraux, un impact fonctionnel de la déficience en BMP9 sur l'efficacité du drainage lymphatique a pu être observé.
- 4) D'un point de vue mécanistique, l'analyse des bases moléculaires de son action a révélé que BMP9 régulait un ensemble de gènes connus pour être déterminants dans le développement des valves : il s'agit de *Foxc2*, *Prox1*, *Cx37*, *EphrinB2* et *Nrp-1*. Ce sont de nouveaux gènes cibles de BMP9.

### 4. Discussion

L'implication de BMP9 dans le développement lymphatique suscite un intérêt grandissant. Plusieurs groupes possèdent maintenant la souris *Bmp9*-KO. Le groupe du Dr. Yan (Genentech, San Francisco) vient de publier, un mois après nous, des résultats avec une souris *Bmp9*-KO qu'ils ont générée. Ils s'intéressent principalement aux développements cardiaque et sanguin, et ils décrivent de manière parcellaire le phénotype lymphatique. Alors que leurs résultats concernant le rôle de BMP9 et de BMP10 dans la vascularisation de la rétine confirment notre travail (voir chapitre suivant), leurs données lymphatiques ne recoupent pas les nôtres. Ils n'observent pas de défauts lymphatiques dans les capillaires de la trachée chez les souris *Bmp9*-KO. Par contre, l'injection de 2 anticorps neutralisant BMP9 et BMP10, ou l'injection d'anti-BMP10 dans les souris *Bmp9*-KO, entraîne une dilatation des vaisseaux capillaires sanguins et lymphatiques dans la trachée (Chen et al., 2013). Pour notre part, l'injection d'un anti-BMP10 aux souriceaux *Bmp9*-KO n'a pas d'effets additifs sur les défauts lymphatiques (nombre de valves du mésentère, observations non publiées). Il faut noter que le fond génétique utilisé et l'anticorps anti-BMP10 sont les mêmes, et que les 2 invalidations consistent à éliminer l'exon 2 de *Bmp9*.

L'équipe du Dr. Yan ne semble pas avoir étudié en détail le système lymphatique (elle ne le mentionne pas) et s'est cantonnée à une évaluation globale dans un seul tissu, la trachée. Nous n'avons pas analysé ce tissu, mais connaissant les disparités temporelles de maturation entre les différents territoires lymphatiques, il est possible que le phénotype lymphatique des souris *Bmp9*-KO ne soit pas présent dans la trachée à P8. De plus les collecteurs lymphatiques n'ont pas été examinés, seuls l'ont été les capillaires de la trachée, ce qui peut également expliquer la divergence des résultats entre nos 2 groupes. Pour pouvoir conclure de manière définitive, il aurait fallu que H. Chen et ses collègues étudient les collecteurs lymphatiques de leurs souris *Bmp9*-KO. En ce qui nous concerne, il serait intéressant d'analyser les capillaires de la trachée chez les souris invalidées pour *Bmp9*.

Niessen et al. ont montré que ALK1-Fc favorisait le bourgeonnement des sphéroïdes de LEC (Niessen et al., 2010), suggérant ainsi les ligands de ALK1 étaient des inhibiteurs du bourgeonnement des CE. Ces résultats ne se confirment pas *in vivo* dans notre modèle d'invalidation de *Bmp9*. En effet, l'absence de BMP9 n'a pas de conséquences sur le nombre de bourgeons dans les vaisseaux lymphatiques de la peau. Des résultats publiés en 2012 ont montré, *in vitro*, un rôle de BMP9 dans l'inhibition de la migration et de la prolifération des LEC en culture (Osada et al., 2012). Ces résultats ne sont pas étonnants dans la mesure où BMP9 possède ces effets sur les CE sanguines (David et al., 2007a) (Scharpfenecker et al., 2007). Cependant l'originalité du propos des auteurs consiste à dire que ce BMP9 provient de l'activation des plaquettes. Ce résultat est surprenant car nous n'avons pas trouvé de BMP9 dans du surnageant de plaquettes activées (données non publiées). La question des effets de BMP9 sur la prolifération et le bourgeonnement des LEC reste posée. Elle pourrait être approfondie par la recherche d'un lien entre les voies BMP9/ALK1 et VEGFC/VEGFR-3. La mesure de la longueur des filopodes sur les bourgeons des souriceaux *Bmp9*-KO permettrait également de préciser le phénotype de nos souris. Par ailleurs, il est envisageable que BMP9 et BMP10 soient redondants dans le contrôle du bourgeonnement et que seul BMP9 soit impliqué dans la maturation du réseau lymphatique. Cet aspect mériterait d'être étudié.

## 5. Perspectives

Notre travail met en lumière pour la première fois l'implication d'un facteur de croissance circulant dans la formation des valves lymphatiques. Nous avons mis en évidence de nouvelles cibles de BMP9 dans les LEC, mais toutes ces cibles étaient déjà connues pour être impliquées dans le développement des valves. Il serait maintenant intéressant d'élargir cette recherche de cibles par une analyse transcriptomique à partir de cellules lymphatiques issues de souris *Bmp9*-KO. Cela permettrait également de trouver de nouveaux acteurs dans le développement du réseau lymphatique.

Il serait également intéressant d'élargir le rôle de BMP9 à la formation des valves veineuses. En effet, les facteurs impliqués dans la formation des valves lymphatiques et veineuses sont souvent partagés, comme PROX1, EphrinB2 et Intégrine- $\alpha 9$  (Bazigou et al., 2011) (Bazigou and Makinen, 2013).

La caractérisation du phénotype lymphatique de la souris *Bmp9*-KO a montré que ses défauts lymphatiques structurels ont un retentissement sur la fonction de drainage. La présence d'un défaut fonctionnel était un préalable indispensable à question suivante : comment se comportent les souris *Bmp9*-KO vis-à-vis de la croissance tumorale, de la dissémination métastatique, ou de l'inflammation?

Pour ce qui est de la partie tumorale, nous envisageons l'injection orthotopique sous cutanée de la lignée de mélanome B16 F10. Cette lignée murine possède un fond génétique C57Bl6 et est décrite comme capable de métastaser, notamment dans les poumons (Zhang et al., 2013b). L'idée est d'évaluer la croissance tumorale primaire et la dissémination métastatique, en lien avec la densité des vaisseaux intra- et péri-tumoraux. La lignée de cancer du sein 4T1 est un meilleur modèle de dissémination métastatique mais qui nécessite de passer dans un fond génétique BalbC. Le rétrocroisement dans ce fond génétique est en cours.

L'inflammation des voies aériennes est un modèle intéressant de lymphangiogenèse inflammatoire chronique. Elle récapitule pour partie les caractéristiques de l'asthme. L'inoculation intranasale de la bactérie *Mycoplasma pulmonis* à des souris entraîne une inflammation des voies aériennes typique, caractérisée notamment par de la lymphangiogenèse, de l'angiogenèse et un œdème de la muqueuse. Par des montages *in toto* de trachée, ce modèle permet d'évaluer la réponse lymphangiogénique, la spécificité lymphatique versus sanguine de réponse à des traitements, ainsi que la fonctionnalité du réseau capillaire grâce à la présence ou non de jonctions en bouton. Par ailleurs, ce modèle d'inflammation peut nous permettre d'étudier plus en détail la lymphangiogenèse chez les souris *Bmp9*-KO, ce que nous avons uniquement évalué par le nombre de bourgeons au niveau de la peau chez des fœtus à E15.5. Nous n'avions alors pas trouvé de différences entre les souris *Bmp9*-KO et les WT. D'autres modèles d'inflammation chronique existent, notamment de la peau. Ils sont moins intéressants pour nous car ils utilisent des souris transgéniques (Yao et al., 2012a) (Zraggen et al., 2013) (Baluk et al., 2005). Cependant, l'utilisation du modèle d'inflammation des voies aériennes est suspendue à la confirmation de la présence d'un phénotype dans la trachée des souris *Bmp9*-KO.

Chez l'humain, nos résultats ouvrent aussi des perspectives d'étude en ce qui concerne les lymphœdèmes. Il serait intéressant d'évaluer les taux circulants de BMP9 chez des patientes ayant subi une mastectomie avec un curage axillaire. L'idée serait de rechercher une corrélation entre les taux de BMP9 et la survenue d'un lymphœdème. A ce sujet il faut mentionner une étude transcriptomique réalisée à partir de tissu de patients œdémateux et de personnes saines (Lin et al., 2012). Parmi les ARNm différenciellement exprimés se retrouve celui de BMP10 et mais pas celui de BMP9. Cependant, le site principal d'expression de BMP9 étant le foie (Bidart et al., 2012), le niveau d'ARNm de BMP9 dans les tissus périphériques n'est pas forcément la meilleure manière de rechercher des différences entre deux situations.

Cette question du dosage de BMP9 dans la lymphe est intéressante et elle débouche sur celle de la présence de BMP10 dans ce fluide. En effet, nous montrons que BMP10 n'est pas capable de pallier l'absence de BMP9 dans le développement lymphatique. Ce n'est pas le cas dans d'autres processus, comme vont le montrer les paragraphes suivants. La spécificité de BMP9 vis-à-vis de BMP10 dans le réseau lymphatique sera discutée dans les perspectives générales.

## II. L'angiogenèse postnatale de la rétine

### 1. Contexte de l'étude

Le phénotype lymphatique décrit chez les souris *Bmp9*-KO n'a pas été chronologiquement le premier mis en évidence. Nous avons initialement recherché un phénotype sanguin car c'était dans compartiment vasculaire que les effets de BMP9 et de ALK1 avaient surtout été publiés (Scharpfenecker et al., 2007) (David et al., 2008) (Urness et al., 2000) (Oh et al., 2000). Pour cela, nous avons utilisé le modèle de l'angiogenèse postnatale de la rétine de souris. C'est un modèle d'angiogenèse physiologique qui se base sur le fait qu'à sa naissance, la rétine du souriceau est avasculaire. Le développement du réseau commence par le centre, à l'embranchement du nerf optique, et se développe en une semaine jusqu'à la périphérie de la rétine (Connolly et al., 1988).

### 2. Résultats

Les résultats de ce travail ont été publiés dans *Blood*, en 2012, sous le titre «BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling » (Ricard et al., 2012).

J'ai principalement participé à la partie *in vivo* de ce travail, dont l'auteur principal est Nicolas Ricard, le doctorant qui m'a précédé dans l'équipe.

# blood

2012 119: 6162-6171  
Prepublished online May 7, 2012;  
doi:10.1182/blood-2012-01-407593

## **BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling**

Nicolas Ricard, Delphine Ciais, Sandrine Levet, Mariela Subileau, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Marie Bidart, Jean-Jacques Feige and Sabine Bailly

---

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/119/25/6162.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Vascular Biology](#) (411 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub\\_requests](http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.

Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



# BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling

Nicolas Ricard,<sup>1,3</sup> \*Delphine Ciais,<sup>1,3</sup> \*Sandrine Levet,<sup>1,3</sup> Mariela Subileau,<sup>1,3</sup> Christine Mallet,<sup>1,3</sup> Teresa A. Zimmers,<sup>4</sup> Se-Jin Lee,<sup>5</sup> Marie Bidart,<sup>1,3</sup> Jean-Jacques Feige,<sup>1,3</sup> and Sabine Bailly<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1036, Grenoble, France; <sup>2</sup>Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant/Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, France; <sup>3</sup>Université Joseph Fourier-Grenoble 1, Grenoble, France; <sup>4</sup>Department of Cancer Biology and Surgery, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA; <sup>5</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD; and <sup>6</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Pôle Recherche, Grenoble, France

**ALK1 is a type I receptor of the TGF- $\beta$  family that is involved in angiogenesis. Circulating BMP9 was identified as a specific ligand for ALK1 inducing vascular quiescence. In this work, we found that blocking BMP9 with a neutralizing antibody in newborn mice significantly increased retinal vascular density. Surprisingly, *Bmp9*-KO mice did not show any defect in retinal vascularization. However, injection of the extracellular domain**

**of ALK1 impaired retinal vascularization in *Bmp9*-KO mice, implicating another ligand for ALK1. Interestingly, we detected a high level of circulating BMP10 in WT and *Bmp9*-KO pups. Further, we found that injection of a neutralizing anti-BMP10 antibody to *Bmp9*-KO pups reduced retinal vascular expansion and increased vascular density, whereas injection of this antibody to WT pups did not affect the retinal vasculature. These data suggested**

**that BMP9 and BMP10 are important in postnatal vascular remodeling of the retina and that BMP10 can substitute for BMP9. In vitro stimulation of endothelial cells by BMP9 and BMP10 increased the expression of genes involved in the Notch signaling pathway (Jagged1, Dll4, Hey1, Hey2, Hes1) and decreased apelin expression, suggesting a possible cross-talk between these pathways and the BMP pathway. (*Blood*. 2012;119(25):6162-6171)**

## Introduction

Activin receptor-like kinase 1 (ALK1) is a type I receptor of the TGF- $\beta$  receptor family that is specifically expressed by endothelial cells.<sup>1</sup> Mutations in *ACVRL1* (the gene encoding ALK1) and in *ENG* (the gene encoding its co-receptor endoglin) cause Rendu-Osler disease, also known as HHT (hereditary hemorrhagic telangiectasia).<sup>2</sup> HHT is a rare genetic vascular disease characterized by numerous epistaxes, cutaneous telangiectasias and arteriovenous malformations (AVM) in the lungs, liver and central nervous system. ALK1 inactivation in mice leads to embryonic lethality at E11 because of major angiogenesis defects.<sup>3,4</sup> These data clearly demonstrate that ALK1 is an important player in angiogenesis, but its molecular role is still not completely clear.

The retina of newborn mice is avascular, and development of retinal blood vessels progressively occurs during the first week after birth to form a highly organized vascular network composed of arteries, veins and capillaries.<sup>5</sup> Retinal vascularization in newborn mice is therefore a very interesting model to study physiologic angiogenesis. The roles of endoglin and ALK1 in the vascularization of the retina have been recently demonstrated.<sup>6,7</sup> Using endoglin-inducible KO in endothelial cells (Eng-iKO<sup>e</sup>), it was shown that absence of endoglin delayed remodeling of the capillary plexus, increased endothelial proliferation and induced localized AVMs in retinas.<sup>6</sup> It was also published that injection of the extracellular domain of ALK1 (ALK1ecd) strongly affected retinal vascularization further supporting the importance of ALK1 and its ligands in retinal angiogenesis.<sup>7</sup>

In 2007, we identified bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 as specific ligands for ALK1.<sup>8</sup> BMP9 was shown to be

present in adult blood of rodents and humans and to circulate in both an active and an inactive form.<sup>9,10</sup> On the other hand, BMP10 has been shown to be mainly expressed in the embryo and to be involved in heart development.<sup>11</sup> We further showed that addition of serum to endothelial cells induced a phospho-Smad1/5 response that could be completely inhibited by the addition of a neutralizing anti-BMP9 antibody, supporting a major role for BMP9 in adult angiogenesis, while BMP10 function would mainly be restricted to embryogenesis.<sup>9,10</sup> Therefore many studies have focused on the role of BMP9 on angiogenesis. The in vitro effects of BMP9 on endothelial cell migration and proliferation are still under debate, as some groups have found an inhibition,<sup>8,12</sup> while another group, using endothelial cells from a different tissue origin, has described an induction.<sup>13</sup> BMP9 was also shown to inhibit ex vivo endothelial sprouting from metatarsals<sup>12</sup> and to inhibit FGF-2 induced angiogenesis in vivo in the mouse angiogenesis model of subcutaneously implanted sponges,<sup>10</sup> while it increased angiogenesis in a Matrigel plug assay and in a xenograft model of human pancreatic cancer.<sup>13</sup> Taken together these data demonstrate that BMP9 is involved in angiogenesis, although its precise cellular functions are still under debate. All of these prior studies have addressed the role of BMP9 by supplementing BMP9 in vitro or in vivo. To date, nobody has addressed the effect of blocking BMP9 in vivo on angiogenesis.

To address this issue, we investigated the role of endogenous BMP9 on retinal angiogenesis using anti-BMP9 antibodies and *Bmp9*-KO mice. This study allowed us to demonstrate that BMP9 and BMP10 control retinal postnatal vascularization, one being able to rescue the absence of the other. Injection of neutralizing

Submitted January 30, 2012; accepted April 25, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 7, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-01-407593.

\*D.C. and S.L. are co-second authors.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

**Table 1. Primer list used for RT-qPCR**

Gene	Mouse primers	Human primers
Dll4		ACTGGGAGAAGAAAGTGGACAGGT AGTTCACAGTAGGTGCCCGTGAAT
Jagged1		AGTGGTCTTTTCAGGTGTGAGCAGT TTGTGAGCCTAATCCCTGCCAGAA
Apelin		GAATCTGCGGCTCTGCGTGC TCGGGAAGCGGCATCAGGGA
Hey1		AGCTAGAAAAAGCCGAGATCCTGCA CCCGAAATCCCAAACCTCCGATAGTC
Hes1		GCTGCTACCCAGCCAGTGTCT TCTCCAGCTTGGAATGCCGC
Hey2		ACCATCGACGTGGGGAGCGA ATCCGATCCCGACGCCCTTTTC
HPRT	CACAGGACTAGAACACCTGC GCTGGTGAAGGACCTCT	TTGAGCACACAGAGGGGTACAATG ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT
BMP9	GAAGAGGAGCACCGGAGCCA AGGTTGGCACCCCATGTCA	

BMP10 antibodies to *Bmp9*-KO mice induced a higher vessel density and multilayered retinal vascularization suggesting a possible role of these 2 factors in vascular remodeling. We also found that BMP9 and BMP10 significantly regulated expression of components of the Notch and apelin signaling pathways, both of which are known as important regulators of retinal vascularization.

## Methods

### Mice

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. OF1 mice were bought from Charles River Laboratories. *Bmp9*-KO null mice were obtained by homologous recombination in R1 embryonic stem cells such that exon 2 encoding the entire mature C-terminal region was replaced by a neomycin resistance cassette. Heterozygous offspring of chimeras were mated out 9 generations to C57BL/6J (S.-J.L. and T.A.Z., Arteriovenous malformations and skeletal abnormalities in mice deficient for *Gdf2/Bmp9*, manuscript in preparation).

Inhalation anesthesia with isoflurane was performed before blood puncture. Blood was collected into EDTA-coated tubes (BD Biosciences) from OF1 and C57BL/6 wild-type (WT) and *Bmp9*-KO mouse embryos and pups, and plasma was frozen until BRE activity determination or BMP9 and BMP10 measurements.

Recombinant mouse ALK1 extracellular domain (ALK1ecd, 770-MA; R&D Systems) and anti-human BMP9 monoclonal antibody (MAB3209; R&D Systems) were prepared at 2  $\mu$ g/ $\mu$ L. Anti-human BMP10 monoclonal antibody (MAB2926; R&D Systems) was prepared at 6  $\mu$ g/ $\mu$ L. Injections were done intraperitoneally in mice at postnatal day 1 (P1) and P3 (5 mg/kg for ALK1ecd and anti-BMP9, 15 mg/kg for anti-BMP10) and the mice were killed at P5 or P6. BrdU (B-5002; Sigma-Aldrich) was freshly diluted in PBS and injected intraperitoneally in P5 mice at 50 mg/kg. Two hours later, the mice were killed.

### Retinal whole mount staining and imaging

Eyes were collected between P5 and P10 and fixed 2 hours at room temperature (RT) in 4% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) in PBS and then washed in PBS. Retina isolation was performed as described.<sup>14</sup> Retinas were fixed 30 minutes in 4% PFA at RT and then saturated and permeabilized overnight in 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS at 4°C. Retinas were then incubated for 1 hour at RT with biotinylated Isolectin B4 (iB4, 1/20, L2140; Sigma-Aldrich) and/or rabbit anti-NG2 antibody (homemade, 1/200) diluted in wash buffer (1% BSA, 0.5% Tween in PBS). Retinas were washed 5  $\times$  20 minutes with wash buffer at RT. Retinas were then incubated for 1 hour at RT in washing buffer with Streptavidin AlexaFluor 488 conjugate (S11223; Invitrogen) diluted at 5  $\mu$ g/mL for iB4 staining and donkey anti-rabbit Cy3 antibody (711-165-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted at 1:200 for NG2 detection. Retinas were washed 5  $\times$  20 minutes at RT with wash buffer. For BrdU labeling, retinas were incubated in HCl 6N, 0.1% Triton X-100 for 15 minutes at RT after iB4 labeling. Retinas were then washed in 0.1M Tris-HCl pH8 (2  $\times$  10 minutes) and in PBS (2  $\times$  10 minutes). After saturation in 1% BSA, 1% Triton X-100 for 1 hour at room temperature, retinas were incubated

overnight at 4°C with mouse anti-BrdU monoclonal antibody (347580; BD Bioscience) diluted in wash buffer (1/50). Retinas were then washed 5  $\times$  20 minutes in wash buffer and incubated with goat anti-mouse Cy3 antibody (115-165-166; Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 hour at RT. Retinas were then washed 5  $\times$  20 minutes in wash buffer. Mounting of stained retinas was performed as described.<sup>14</sup> Observations were made using confocal microscopy (Leica; TCS SP2). The number of branchpoints was counted manually per 200  $\times$  200  $\mu$ m visual field from  $\times$ 63 micrographs; an average of 12 fields per region, front or capillary plexus were taken for each retina as previously described.<sup>15</sup> Each point at which 3 capillary segments met was counted as 1 junction; intersections of 4 capillary segments were counted as 2 junctions, and so on.

### Cell lines

NIH-3T3 fibroblasts cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium, 4.5 g/L glucose (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest). Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAEC; PromoCell) were maintained in endothelial growth medium (PromoCell) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; PromoCell).

### Quantitative RT-PCR

HPAEC were stimulated for the indicated times with recombinant human BMP9 (0.5 ng/mL) or recombinant human BMP10 (0.5 ng/mL) from R&D Systems. At the times indicated, cells were lysed and RNAs were extracted using the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel). Total RNAs from the liver of *Bmp9*-KO and WT mice were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). cDNAs were generated from 1  $\mu$ g total RNA by reverse transcription using the iScript system (Bio-Rad) according to the manufacturer recommendations. Real-time PCR was performed using Bio-Rad CFX96 apparatus and qPCR Master Mix (Promega). Specific primers used are listed in Table 1.

### Reporter gene constructs

The reporter plasmid pGL3(BRE)2-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element was kindly provided by Dr P. ten Dijke<sup>16</sup> (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands). The ALK1 plasmid cloned in pcDNA3 was kindly provided by Dr C. H. Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden). The pRL-TKluc plasmid encoding renilla luciferase downstream of the thymidine kinase promoter was purchased from Promega.

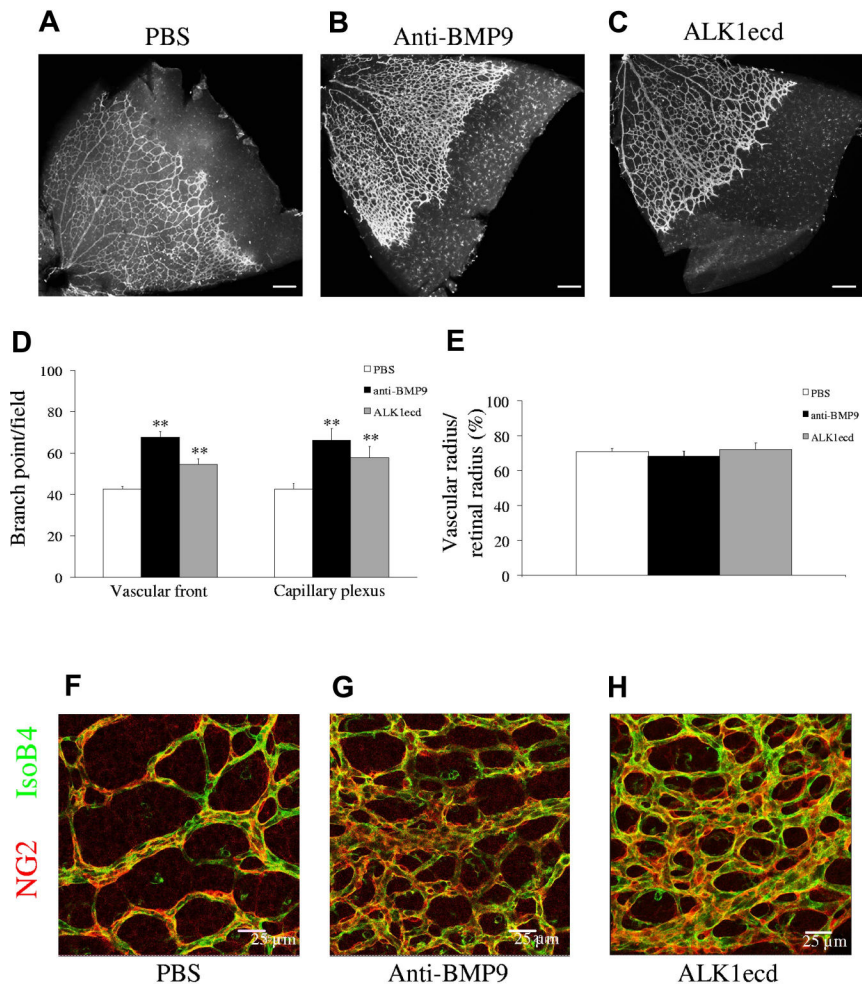
### DNA transfection and dual luciferase activity assay

NIH-3T3 cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) using lipofectamine (Invitrogen) with 0.2  $\mu$ g pGL3(BRE)2-luc, 0.02  $\mu$ g of pRL-TKluc, and 0.005  $\mu$ g of ALK1 plasmid per well. Four hours after transfection, cells were treated for 15 hours with 0.5% of the indicated mouse plasma or recombinant BMP9 (5-100 pg/mL; R&D Systems). Firefly and renilla luciferase activities were measured sequentially with the Dual Luciferase Reporter Assay (Promega).

### BMP10 and BMP9 ELISAs

Mouse plasma BMP10 (1/20 dilution) was measured using a commercially available ELISA (Uscn Life Science Inc). Mouse plasma BMP9 (1/2 dilution) was measured as previously described.<sup>9</sup>





**Figure 1. Anti-BMP9 treatment increases vascularization of the retina.** (A-C) Visualization of blood vessels by isolectin B4 (iB4) staining of OF1 retinas at P6 after treatment with BMP9-blocking antibodies (5 mg/kg) or recombinant ALK1ecd (5 mg/kg) injected at P1 and P3. (D) Number of branching points at the capillary plexus and at the front of migration. (E) Bar graphs show the relative distance covered by the vascular plexus calculated as the ratio of the vascular radius over the retinal radius in percentage. (F-H) Pericyte coverage visualized by NG2 immunostaining of OF1 retinas at P6. Panels A through H show data from 2 litters containing 10 PBS treated pups, 9 anti-BMP9 treated pups and 5 ALK1ecd treated pups. Error bars show SEM. \*\* $P < .01$  versus PBS group. (A-C) Scale bar = 200  $\mu$ m.

## Statistical analyses

Mann-Whitney tests were used to assess the statistical differences between measurements (Prism 4, GraphPad Software). Error bars show SEM. Differences were considered statistically significant for  $P$  values of .05 or less.

## Results

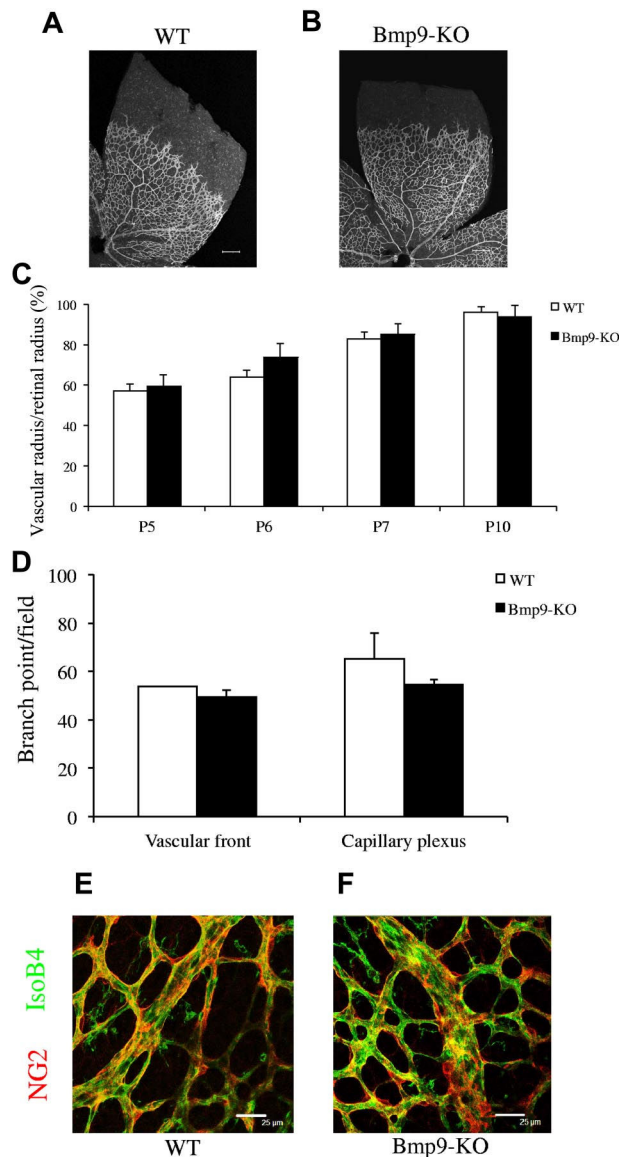
### Anti-BMP9 treatment increases vascular density of the retina of WT mice

It was previously described that injection of ALK1ecd to newborn pups increased postnatal retinal vascular density.<sup>7</sup> This indicated that the ALK1 pathway controls postnatal angiogenesis. However, in this prior study, the nature of the ligand(s) blocked by the addition of ALK1ecd was not characterized. We have previously shown that BMP9 binds to ALK1 with strong affinity ( $EC_{50} = 2$  pM)<sup>8</sup> and that BMP9 circulates in a biologically active form in human and mouse blood and is present at higher levels around birth than during adulthood (6 ng/mL in newborn vs 2 ng/mL in adult mice).<sup>9,10</sup> We therefore asked whether circulating BMP9 triggered the biologic effects blocked by ALK1ecd. Analysis of mouse retinas at postnatal day 6 (P6) after a systemic treatment of pups (OF1 background) with a monoclonal anti-BMP9 antibody (5 mg/kg, at P1 and P3) revealed vascular patterning defects, with vessels forming a hyperbranched plexus (Figure 1A-B). We quantified the number of branching points both at the

vascular front and at the capillary plexus and found that anti-BMP9 treatment significantly increased vascular branching (Figure 1D). We observed a similar effect with ALK1ecd treatment (5 mg/kg; Figure 1C-D). On the other hand, we did not observe any differences on radial vascular expansion (Figure 1E). The coverage of the vessels by pericytes, as assessed by immunostaining of the proteoglycan NG2, was not modified by treatment with either anti-BMP9 or ALK1ecd (Figure 1F-H). Similar results on the vascularization of the retina were observed in mice from another genetic background (C57Bl6/J, data not shown). To confirm that treatment with anti-BMP9 or ALK1ecd completely abolished plasma BMP9 activity, we measured active circulating BMP9 levels in these mice using a BMP responsive (BRE) reporter assay. Specifically, 0.5% of plasma from P5 pups was added to 3T3 cells transfected with the BRE-reporter plasmid together with a plasmid encoding ALK1. Under these conditions, we have previously described that only BMP9 is detected.<sup>10</sup> We found that treatment with anti-BMP9 or ALK1ecd strongly decreased BMP9 circulating activity (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

### Bmp9-KO mice present no detectable defects in retinal vascularization

Next, we wondered whether *Bmp9*-KO mice would exhibit defects in retinal vascularization. *Bmp9*-KO adult mice are viable and fertile, and pups are grossly normal. A full characterization of the



**Figure 2. *Bmp9*-KO mice have a normal vascularized retina.** (A-B) Visualization of blood vessels by isolectin B4 (iB4) staining of WT and *Bmp9*-KO retinas at P6. (C) Bar graphs show the relative distance covered by the vascular plexus calculated as the ratio of the vascular radius over the retinal radius in percentage at P5 (n = 6), P6 (n = 7), P7 (n = 9), and P10 (n = 4) from 2 litters. (D) Number of branching points at the capillary plexus and at the front of migration of P6 pups (n = 3 in each group). (E-F) Pericyte coverage was visualized by NG2 immunostaining. Error bars show SEM. (A-B) Scale bar = 200  $\mu$ m.

adult mice will be described elsewhere (T.A.Z., S.-J.L., Arterio-venous malformations and skeletal abnormalities in mice deficient for *Gdf2/Bmp9*, manuscript in preparation). In these mice, no BMP9 mRNA was detected by RT-PCR in liver (supplemental Figure 2A). Furthermore, no circulating BMP9 in *Bmp9*-KO plasma was detected either using a BMP9 ELISA (supplemental Figure 2B) or by measuring the BRE activity (supplemental Figure 2C). Pups were killed between P5 and P10, and no obvious defects in the organization of the retinal vascular network could be observed in *Bmp9*-KO versus wild-type (WT) mice (Figure 2A-B). The veins and the arteries were well-differentiated and organized. The radial expansion of the vascular network measured at different postnatal days (P5-P10) was not significantly different between the 2 groups (Figure 2C). The numbers of branching points in the

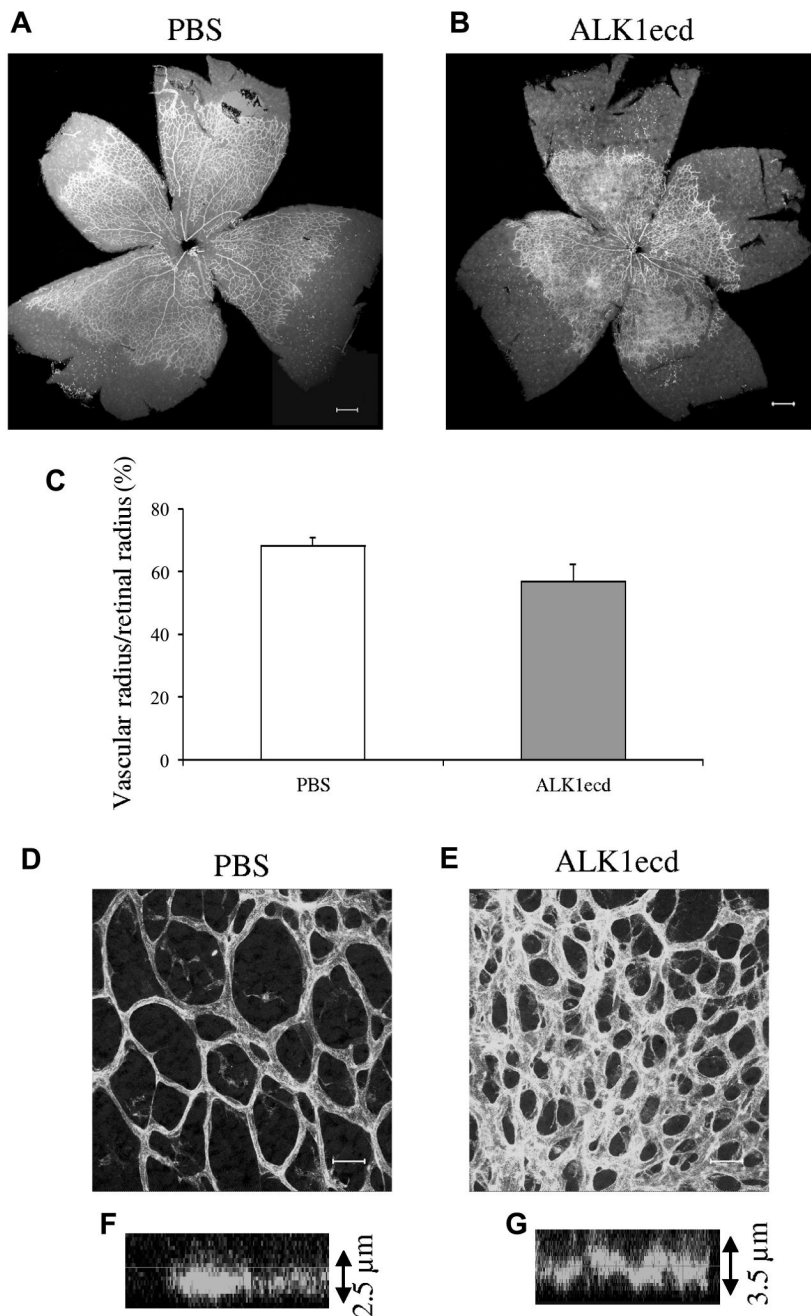
retinal vasculature were not significantly different between WT and *Bmp9*-KO mice (Figure 2D). We did not observe any differences in vessel coverage by pericytes, using NG2 labeling, between WT and *Bmp9*-KO mice at P6 (Figure 2E-F). These data indicate that interfering with BMP9 through the use of blocking antibodies versus through genetic targeting generate different phenotypes.

#### ALK1ecd treatment of *Bmp9*-KO mice strongly modifies retinal vascularization

A possible explanation that could account for the discrepancy between the absence of phenotype in *Bmp9*-KO mice and the increase of vascular branching in response to an acute blockade of BMP9 with anti-BMP9 antibody is that either the anti-BMP9 antibody cross reacts with another BMP or that *Bmp9*-KO mouse might have compensated for the chronic loss of BMP9. To test the first hypothesis, we added anti-BMP9 antibodies to *Bmp9*-KO mice and found no significant differences with PBS-treated pups (data not shown), thereby excluding a possible cross-reaction of the anti-BMP9 antibody with another BMP. We next tested for the presence of another ALK1 ligand by injecting ALK1ecd into *Bmp9*-KO mice. We observed that ALK1ecd treatment strongly affected retinal vascularization of *Bmp9*-KO pups (Figure 3A-B). The vascularization was denser, and the radial expansion of the vascular network was slightly decreased (Figure 3C). Higher power views showed that the plexus in the retinas of ALK1ecd treated mice consisted of capillaries that were larger in diameter (as visualized along the z-axis), more highly interconnected and multilayered (Figure 3D-G). To determine whether this was attributable to an increased endothelial cell number, treated retinas were stained for BrdU. In control retinas at P5, veins and peripheral capillaries contained proliferating cells, whereas arteries were almost exclusively composed of nonproliferating cells (supplemental Figure 3A-B). In contrast, in ALK1ecd treated pups, most of the vascular plexus was composed of proliferating cells (supplemental Figure 3C-D). Taken together, these data support the hypothesis of functional rescue in *Bmp9*-KO mice by another ALK1 ligand.

#### Anti-BMP10 treatment disrupts retinal vascularization in *Bmp9*-KO mice

We previously showed that BMP9 and BMP10 bind with a similarly strong affinity to ALK1.<sup>8</sup> Therefore, we hypothesized that BMP10 is the ligand blocked by ALK1ecd in *Bmp9*-KO mice. To test this hypothesis, we first checked whether we could detect circulating BMP10. Using a murine BMP10 ELISA, we found high levels of BMP10 from embryonic day E17.5 until postnatal day P5 (10-20 ng/mL) in WT plasma, which then decreased progressively with age (Figure 4A). We next measured circulating BMP10 levels in WT and *Bmp9*-KO P5 pups and found no statistically significant differences between *Bmp9*-KO pups and WT pups (12 vs 10 ng/mL, respectively; Figure 4B). This circulating BMP10 was unable to activate the BRE reporter gene using 0.5% plasma demonstrating that BMP10 circulates under an inactive form (supplemental Figure 2C). This result is in accordance with our previous work showing that the circulating BRE-inducing activity is solely because of active BMP9.<sup>10</sup> This result demonstrated the absence of a circulating compensating BRE-inducing activity in *Bmp9*-KO pups. Still, we tested whether BMP10 could play a role in postnatal angiogenesis using an anti-BMP10 neutralizing antibody. We used a higher quantity of anti-BMP10 antibody (15 mg/mL) than the quantity used for the anti-BMP9 antibody (5 mg/mL), as the anti-BMP10 antibody was less effective in vitro than the anti-BMP9 antibody

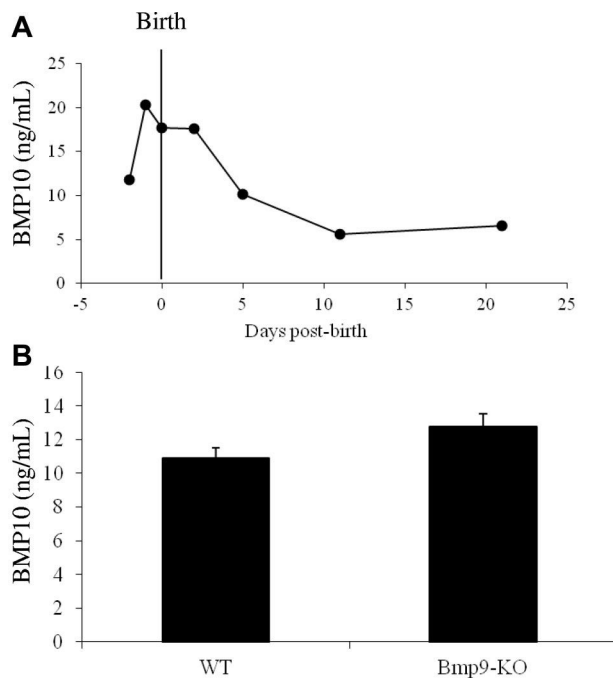


**Figure 3. ALK1ecd treatment in *Bmp9*-KO mice increases vascularization of the retina.** (A-B) Visualization of blood vessels by isolectin B4 (iB4) staining of retinas at P5 from *Bmp9*-KO mice treated or not with ALK1ecd (5 mg/kg) injected at P1 and P3. (C) Bar graphs show the relative distance covered by the vascular plexus calculated as the ratio of the vascular radius over the retinal radius in percentage. (D-E) Higher magnifications of the retinas show that ALK1ecd treatment in *Bmp9*-KO mice lead to larger and multilayered blood vessels (see also z scan in panels F and G). Panels A through G show data from 2 litters containing 8 PBS treated *Bmp9*-KO mice and 7 ALK1ecd treated *Bmp9*-KO mice. Error bars show SEM. (A-B) Scale bar = 200  $\mu$ m. (D-E) Scale bar = 25  $\mu$ m.

(data not shown). Systemic injection of anti-BMP10 antibodies into *Bmp9*-KO pups at P1 and P3 significantly decreased the overall growth of the pups and pulmonary hemorrhages were observed (data not shown). Some of their vessels also appeared to be dilated (supplemental Figure 4). Examining vascularization of their retina, we found that anti-BMP10 treatment in *Bmp9*-KO pups resulted in a dramatic increase in vascular density and a strong decrease in vascular radial expansion (Figure 5A-B,E). In contrast, anti-BMP10 antibody injection in WT pups had no significant effects on the pups and did not alter retinal vascularization of the retina (Figure 5C-D,F). The addition of anti-BMP9 and anti-BMP10 antibodies to WT pups induced a similar effect on retinal expansion and density as compared with addition of anti-BMP10 antibody in *Bmp9*-KO pups (data not shown). Higher power views showed that the vascular network in the retinas of *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies was formed of capillaries that

were hyperfused, larger in diameter and that presented several layers (as visualized along the z-axis, Figure 5G-J). Normally, the vascular network extends directionally in a narrow plane defined by the astrocytic network secreting VEGF-A<sup>17</sup> as observed in Figure 5G. In contrast, in *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10, we clearly see the presence of several layers of vessels (Figure 5H). This is particularly well illustrated when looking at serial confocal slices where at least 2 layers can be detected (supplemental Figure 5A-C). In some areas, the vessels coalesced to form a plexus as already observed with ALK1ecd-treated mice, although the effect was stronger with anti-BMP10 antibodies (Figures 3B and 5B). We did not observe a significant effect of anti-BMP10 antibody treatment on the number of tip cells at the periphery of the vascularized retina in *Bmp9*-KO mice (data not shown). Taken together, these data therefore support a cooperative role for BMP9 and BMP10 in postnatal angiogenesis of the retina.





**Figure 4.** BMP10 expression in WT and *Bmp9*-KO mice plasma. (A-B) BMP10 levels were measured from pooled diluted plasma (1/20) taken from WT OF1 mice at the indicated developmental stages (A) and from WT ( $n = 9$ ) and *Bmp9*-KO ( $n = 14$ ) P5 pups (B) with a murine BMP10 ELISA. Error bars show SEM.

#### In vitro stimulation of endothelial cells with BMP9 and BMP10 regulates the Notch signaling pathway and apelin expression

The phenotype resulting from blockade of BMP9 and BMP10 partially phenocopied the hyperplastic vascular pattern obtained from inhibition of Dll4/Notch signaling and apelin inactivation.<sup>18,19</sup> We therefore analyzed whether these genes were targets of BMP9 and BMP10 in endothelial cells. Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAEC) were treated with BMP9 or BMP10 (0.5 ng/mL), and RNA was extracted at different time points (1 to 6 hours) for quantitation by RT-qPCR. We found that BMP9 and BMP10 transiently increased expression of the Notch ligands Dll4 and Jagged1 (Figure 6). It is interesting to note that Dll4 mRNA levels were increased during the first 2 hours of stimulation but then reduced to lower than its basal level at 4 and 6 hours after stimulation. This was not the case for Jagged1. BMP9 and BMP10 stimulation also strongly and transiently increased Hey1, Hey2 and Hes1 mRNA levels (Figure 6). On the other hand, mRNA apelin expression was strongly reduced in response to BMP9 and BMP10 treatment (Figure 6). Taken together, these data show that BMP9 and BMP10 modulate genes of the Notch and apelin signaling pathways suggesting a possible cooperation between these pathways.

## Discussion

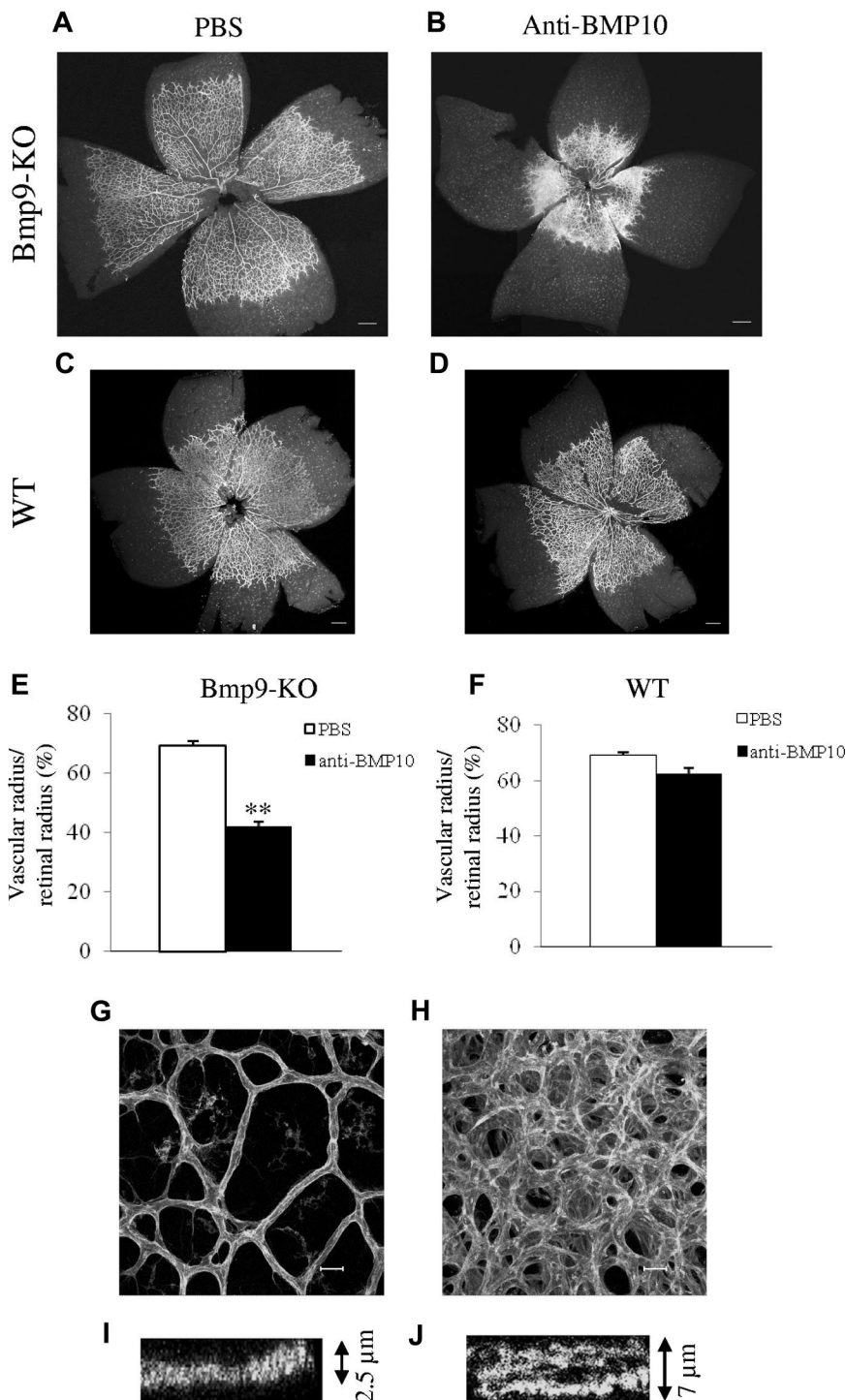
The goal of this study was to analyze the role of BMP9 and other possible ligands for ALK1 in angiogenesis using the model of postnatal retinal vascularization. The present work shows that BMP9, and also BMP10, are involved in retinal angiogenesis and that they can, at least partially, functionally substitute for each other. These data indicate that the ALK1 neutralizing treatments currently tested in preclinical studies for cancer treatment<sup>20</sup> will affect both BMP9 and BMP10 functions.

Using a neutralizing anti-BMP9 antibody, we demonstrated that BMP9 blockade induces an increase in retinal vascular density,

supporting a role for BMP9 in the remodeling of the retinal vascularization. However, *Bmp9*-KO pups had no obvious defect in the vascularization. A similar discrepancy in retinal vascularization between VEGFR-3 antibodies and genetic targeting has been previously reported.<sup>21</sup> One possible explanation for this discrepancy would be a possible cross-reaction of the anti-BMP9 antibody with another BMP. However, injection of anti-BMP9 antibodies to *Bmp9*-KO pups did not affect retinal vascularization (data not shown). This demonstrates that acute blockade might not be similar to permanent blockade and could indicate a possible adaptation to the loss of BMP9 in *Bmp9*-KO mice through expression of another ALK1 ligand. Indeed, injection of ALK1ecd in *Bmp9*-KO pups induced a strong modification of retinal vascularization confirming the presence of another ALK1 ligand. Using an anti-BMP10 antibody, we demonstrated that BMP10 can substitute for BMP9. However, no significant difference in circulating BMP10 levels or BRE activity could be observed between WT and *Bmp9*-KO pups. Further work will be necessary to understand the reason of the absence of phenotype in *Bmp9*-KO pups.

Our data demonstrate a new and unexpected function for BMP10 in postnatal angiogenesis. Indeed, up to now, BMP10 was mainly known to play a critical role in heart formation.<sup>11</sup> Still, BMP10 has also been described to be present in human and murine adult sera using a proteomic approach.<sup>22</sup> However, we previously demonstrated that plasmatic BRE-inducing activity via ALK1 is only attributable to BMP9,<sup>10</sup> which, in contrast to BMP10, was shown to be active when bound to its prodomain.<sup>23,24</sup> Our present work further supports these biochemical data. Indeed, we confirm the presence of circulating BMP10 in the plasma of mouse neonates and could determine, for the first time, that it circulates at a concentration of around 10 ng/mL. These levels are elevated in mouse embryos just before birth and during early postnatal life, when there is active retinal angiogenesis occurring, and then steadily decrease as blood vessels reach maturity. This profile of expression is extremely similar to the one we observed for circulating BMP9.<sup>9</sup> However, this circulating BMP10 is not able to activate the BRE promoter via ALK1, as we observed no BRE-inducing activity in *Bmp9*-KO plasma. Still, adding anti-BMP10 antibodies to *Bmp9*-KO mice had a dramatic effect on postnatal vascularization suggesting that BMP10 must be locally activated. BMP1 has been recently demonstrated to activate BMP10.<sup>24</sup> We detected BMP1 mRNA in the retina, suggesting that a local activation of BMP10 could occur. However, no changes in its mRNA level could be observed between WT pups and *Bmp9*-KO pups (data not shown). Another possibility is that circulating BMP10, while being unable to activate the BRE activity, could still be able to regulate retinal vascularization via a Smad-independent mechanism. Indeed, we have previously shown that the constitutively active form of ALK1 inhibited endothelial cell migration in a Smad-independent manner involving MAP kinase signaling (JNK and ERK).<sup>25</sup> Further, *Eng*-iKO<sup>6</sup> retinas exhibited delayed remodeling of the capillary plexus while their phospho-Smad1/5 levels were not affected as compared with WT pups.<sup>26</sup>

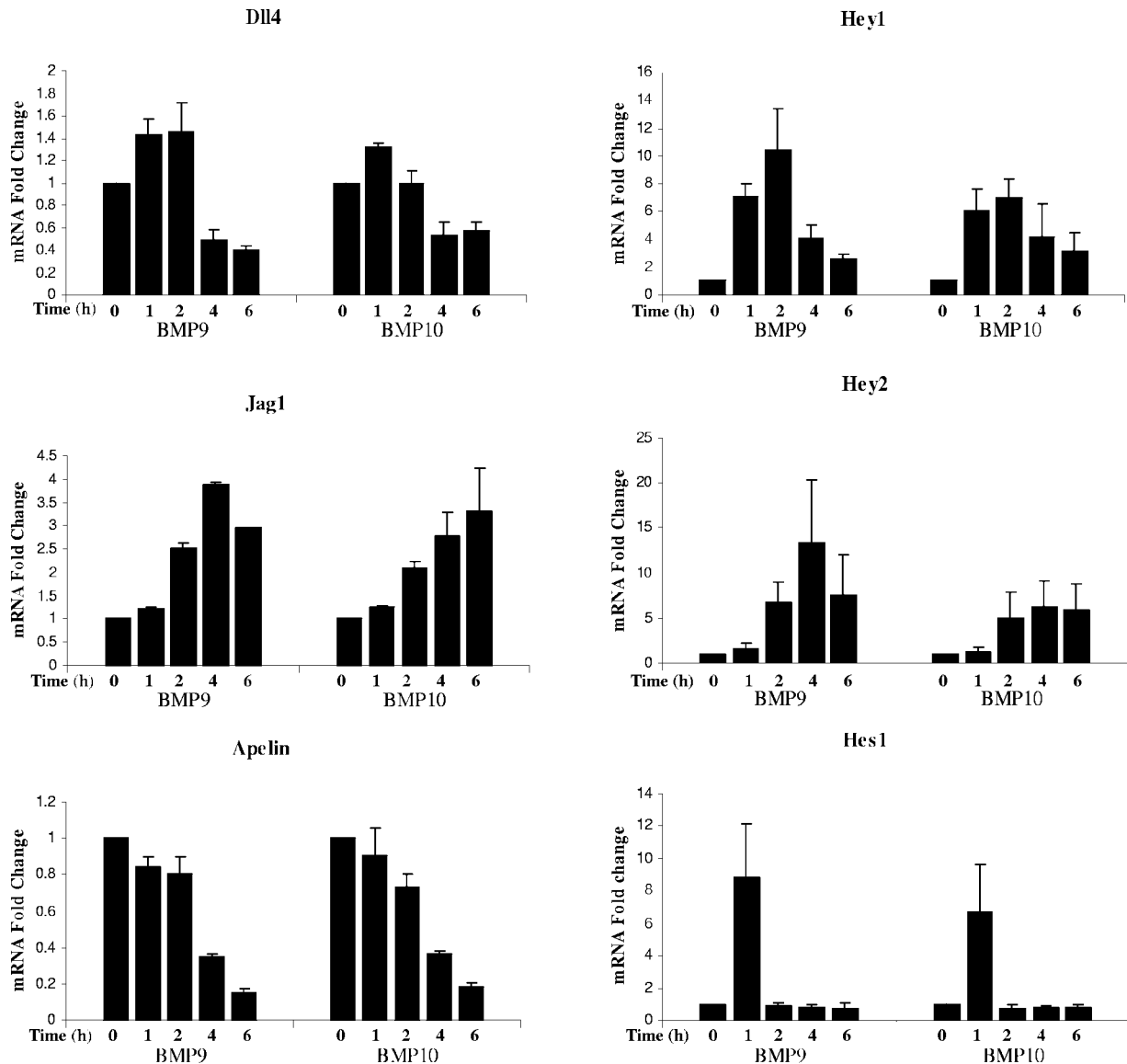
Anti-BMP10 treatment had no significant effect on the vascularization of WT retinas, indicating that the presence of BMP9 is sufficient to maintain retinal vascularization. This was not the case with anti-BMP9 treatment, which can on its own already affect retinal vascularization. It is tempting to relate this differential effect to the differences in latency between BMP9 and BMP10. BMP9 being available in the circulation in a biologically active form is efficient as is, while BMP10 circulating in an inactive form would probably require local rate-limiting proteolytic activation to be



**Figure 5. Anti-BMP10 treatment disrupts vascularization of the retina of *Bmp9-KO* mice.** Visualization of blood vessels by isolectin B4 (IB4) staining of retinas at P5 from *Bmp9-KO* (A-B) or WT (C-D) mice treated with PBS or anti-BMP10 antibody (15 mg/kg) injected at P1 and P3. (E-F) Bar graphs show the relative distance covered by the vascular plexus calculated as the ratio of the vascular radius over the retinal radius in percentage in *Bmp9-KO* mice (E) and in WT mice (F). (G-H) Higher magnifications of the retinas show that anti-BMP10 treatment in *Bmp9-KO* mice lead to larger and multilayered blood vessels (see also z scan in panels I and J). Panels A, B, E, G, H, I, and J show data from 4 litters containing 12 PBS-treated *Bmp9-KO* pups and 7 anti-BMP10 treated pups. Panels C, D, and F show data from 2 litters containing 6 PBS treated WT pups and 6 anti-BMP10 treated pups. Error bars show SEM. \*\* $P < .01$  versus PBS group. (A-D) Scale bar = 200  $\mu$ m. (G-H) Scale bar = 20  $\mu$ m.

efficient. It is also interesting to note that the inhibitory effect of ALK1ecd injection had a lower impact on retinal vascularization than anti-BMP10 antibody treatment in *Bmp9-KO* mice. This can either be because of the fact that ALK1ecd blocks BMP9 and BMP10 active forms, while anti-BMP10 may interact with BMP10 active and inactive forms, or to the fact that ALK1ecd half-life is shorter than that of the neutralizing anti-BMP10 antibody, thereby leading to a less severe phenotype. Taken together, these data suggest that BMP9 is important for retinal vascularization, and that at least in absence of BMP9, BMP10 can take over.

Injection of BMP10 antibodies into *Bmp9-KO* mice also affected the overall diameters of vessels (supplemental Figure 4). These data would suggest that BMP9 and BMP10 are involved in the control of vessel diameter. This is in accordance to what has been observed in Alk1-conditional deletion in endothelial cells<sup>27</sup> and in inducible Alk1-conditional deletion in adult mice.<sup>28</sup> Arteriovenous malformations have been described in HHT patients and in retinas of conditional endothelial ENG deletion.<sup>6</sup> We therefore looked for their presence in *Bmp9-KO* retinas treated with anti-BMP10 antibodies but could not detect any. Hemorrhages are also



**Figure 6. BMP9 and BMP10 regulated genes in endothelial cells.** mRNA fold changes in *Dll4*, *Jag1*, *Hey1*, *Hey2*, *Hes1*, and *apelin* mRNA levels in hPAECs stimulated with 0.5 ng/mL BMP9 or BMP10 at different time points (1, 2, 4, and 6 hours). Expression of HPRT was used as the normalization control. Data pooled from 3 individual experiments, each containing 2 replicates. Error bars show SEM.

often observed in many organs in HHT patients. Interestingly, pulmonary hemorrhages could be observed in *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies. These results could suggest that the ligands BMP9 and BMP10 are relevant for HHT pathogenesis.

We focused our analysis on the retina of *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies, which presented the strongest phenotype with a significantly reduced vascular radial expansion and increased vascular density. The vessels were larger and hyperfused, and higher magnification and projection along the z-axis clearly demonstrated the presence of several layers of vessels, while controls had a single layer of vessels. The vascularization of the retina occurs through sprouting angiogenesis, which involves the selection of a leading tip cell triggered by a gradient of VEGF-A. In response to VEGF-A, tip cells become enriched in *Dll4* and instruct adjacent endothelial cells to become stalk cells via *Dll4*/Notch1-mediated lateral inhibition.<sup>17,18</sup> The tip and stalk cell phenotypes are remarkably transient and exchangeable as endothelial cells dynamically shuffle position along the angiogenic sprouts, and

compete for the tip cell position.<sup>29</sup> Multilayered blood vessels have been previously described in mice overexpressing the diffusible VEGF-A-120 isoform, demonstrating the need of a proper VEGF-A gradient for guidance of endothelial cells.<sup>17</sup> This multilayered phenotype was also observed in Eng-iKOE.<sup>26</sup> The phenotype observed here could therefore suggest a defect in tip cell versus stalk cell status, but also in oriented migration and/or polarity. We have previously described a role for ALK1 in orientated migration which could partially explain what is observed here.<sup>30</sup> Looking at retinal vascularization from P2 to P5, we found that anti-BMP10 treatment of *Bmp9*-KO mice inhibited the vascular remodeling of the vessels as soon as P3. In WT pups, the vessels grow steadily and get thinner as they extend. In *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibody, the vessels stopped expanding at P3, failed to thin down and formed multilayered vessels (data not shown). The hyperdensity could also be attributed to the ability of BMP9 and BMP10 to act as quiescence factors via binding to ALK1.<sup>10</sup> Therefore, absence of these 2 factors could induce over-activation of angiogenesis.

*Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies presented a retinal phenotype partially resembling those of *Dll4*<sup>+/-</sup> mice or mice treated with the  $\gamma$ -secretase inhibitor (DAPT), with an increase in branching and a decrease in radial expansion.<sup>15,18,31,32</sup> Jagged1 and Hey1 have been previously described as direct BMP9 target genes in endothelial cells<sup>33</sup> suggesting a possible interconnection of the Notch and BMP pathways. We therefore analyzed whether some of these genes were targets of BMP9 and BMP10 in endothelial cells. We found that BMP9 and BMP10 affected the Notch signaling pathway in a transient manner, increasing the level of *Dll4* ( $\times 1.5$ -fold for BMP9) at early time points, while decreasing *Dll4* lower than its basal level after 4 hours ( $\times 0.4$ -fold for BMP9). Jagged1 expression was increased in response to BMP9 and BMP10, in accordance with a previous work.<sup>33</sup> We further confirmed Hey1 as a target regulated by BMP9 but also by BMP10 and identified Hey2 and Hes1, as new targets. The kinetics of these transcription factors were slightly different, Hes1 was increased at 1 hour and returned to its basal level, Hey1 peaked at 2 hours, while Hey2 peaked at 4 hours. These transient regulations can be linked to the remarkably transient and dynamic changes of endothelial cells from tip to stalk cells.<sup>29</sup> The rapid induction of some of these genes (eg, Hes1) is in favor of a direct effect of BMP9/10 on their expression rather than through a feedback of the Notch signaling pathway. Altogether these results indicate that some of the previously described Notch target genes are also BMP9/BMP10 target genes in endothelial cells. While submitting this manuscript, another study confirmed that BMP9 regulated the expression of Notch target genes.<sup>34</sup> This work further supports the interdependence of the Notch pathway and the BMP9/BMP10 pathways. Cross-signaling between the Notch and BMP/TGF $\beta$ /Smad pathways has been documented in various cell types among which endothelial cells. In endothelial cells, Smad1 and Smad5 form on receptor activation a complex with the Notch intracellular domain (NICD) to potentiate Hey1 expression.<sup>35</sup> A more recent study shows that endothelium-specific inactivation of Smad1/5 impairs Notch signaling, and affects Hes1, Hey1, and Jagged1 expressions in mouse embryos and endothelial cells resulting in deficient vessel organization.<sup>36</sup>

Apelin is the endogenous ligand for the receptor APJ and is expressed in many cells, including endothelial cells. Apelin was shown to stimulate the proliferation and migration of endothelial cells and to be involved in the regulation of blood vessel diameter during angiogenesis.<sup>37,38</sup> Apelin has also been recently shown to be involved in vascularization of the retina.<sup>19,39</sup> Its deletion decreased radial endothelial expansion of the retina, but its effect on vascular density was reported to be different in the 2 published studies. We

found that apelin expression was strongly decreased by either BMP9 or BMP10 treatment in endothelial cells. These data therefore suggest that apelin could be one of the target genes leading to the inhibition of radial vascular expansion and the increase in blood vessel diameter.

In conclusion, we demonstrate here that BMP9, but also BMP10, are important regulators of postnatal angiogenesis. This work proposes a new role for BMP10 in angiogenesis. Furthermore, it supports an important cross-talk between the BMP9/10, the Notch and the apelin pathways during postnatal angiogenesis. This interplay reveals a mechanism whereby endothelial cells make continuous dosage dependent decisions on whether to carry out effective expansion of the vascular network or become quiescent contributing to the maturation of the blood vessels.

## Acknowledgments

This work was supported by Inserm, CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives), UJF (Université Joseph Fourier-Grenoble 1), and Ligue nationale contre le Cancer and ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer). N.R. was supported by the CEA and the ARC. S.L. was supported by the CEA. D.C. was supported by the Fondation Lefoulon-Delalande. Work in S.-J.L.'s laboratory was supported by National Institutes of Health grant R01HD35887/AR060636.

## Authorship

Contribution: N.R., S.L., M.S., D.C., M.B., and C.M. performed research; T.Z. and S.-J.L. generated the *Bmp9*-KO mice; N.R., S.B., and J.J.F. designed research; and S.B., N.R., J.J.F., and D.C. wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: Under licensing agreements between Johns Hopkins University (JHU) and Acceleron Pharma Inc and between JHU and Novartis Inc, S.-J.L. and T.A.Z. are entitled to receive a share of licensing fees received by JHU for the use of *Bmp9* knockout mice. Except for these licensing fees, which are fixed in their total amounts, JHU is not entitled to any additional future payments from Acceleron or Novartis as a result of these agreements. The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Sabine Bailly, U1036 Inserm, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France; e-mail: sbailly@cea.fr.

## References

- Panchenko MP, Williams MC, Brody JS, Yu Q. Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 1):L547-L558.
- Dupuis-Girod S, Bailly S, Plauchu H. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): from molecular biology to patient care. *J Thromb Haemost*. 2010;8(7):1447-1456.
- Urness LD, Sorensen LK, Li DY. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*. 2000;26(3):328-331.
- Oh SP, Seki T, Goss KA, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$  1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2626-2631.
- Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 2007;10(2):77-88.
- Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, et al. Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res*. 2010;106(8):1425-1433.
- Niessen K, Zhang G, Ridgway JB, Chen H, Yan M. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood*. 2010;115(8):1654-1661.
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 2007;109(5):1953-1961.
- Bidart M, Ricard N, Levet S, et al. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(2):313-324.
- David L, Mallet C, Keramidas M, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*. 2008;102(8):914-922.
- Chen H, Shi S, Acosta L, et al. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*. 2004;131(9):2219-2231.
- Schärfenecker M, van Dinther M, Liu Z, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 6):964-972.
- Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 10):1684-1692.
- Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth



- and pathological angiogenesis. *Nat Protoc.* 2009; 4(11):1565-1573.
15. Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, et al. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3219-3224.
  16. Korchynskiy O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem.* 2002;277(7):4883-4891.
  17. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1163-1177.
  18. Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature.* 2007; 445(7129):776-780.
  19. Kasai A, Shintani N, Kato H, et al. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(10):1717-1722.
  20. Cunha SI, Pietras K. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood.* 2011; 117(26):6999-7006.
  21. Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, et al. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat Cell Biol.* 2011;13(10):1202-1213.
  22. Souza TA, Chen X, Guo Y, et al. Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators. *Mol Endocrinol.* 2008;22(12):2689-2702.
  23. Brown MA, Zhao Q, Baker KA, et al. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem.* 2005; 280(26):25111-25118.
  24. Sengle G, Ono RN, Sasaki T, Sakai LY. Prodomains of transforming growth factor beta (TGF-beta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem.* 2011;286(7): 5087-5099.
  25. David L, Mallet C, Vailhe B, Lamouille S, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J Cell Physiol.* 2007;213(2): 484-489.
  26. Mahmoud M, Pia Cumine A, Oh S, Arthur HM. Characterisation of arteriovenous malformation development in two inducible mouse models of HHT1 and HHT2. *Hematol Rep.* 2011;3(Suppl 2):24.
  27. Park SO, Lee YJ, Seki T, et al. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood.* 2008;111(2):633-642.
  28. Park SO, Wankhede M, Lee YJ, et al. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 2009;119(11):3487-3496.
  29. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol.* 2010;12(10):943-953.
  30. Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood.* 2002;100(13): 4495-4501.
  31. Suchting S, Freitas C, le Noble F, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3225-3230.
  32. Phng LK, Potente M, Leslie JD, et al. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell.* 2009;16(1):70-82.
  33. Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, et al. ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(20):8712-8727.
  34. Larrivee B, Prahst C, Gordon E, et al. ALK1 Signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell.* 2012;22(3):489-500.
  35. Itoh F, Itoh S, Goumans MJ, et al. Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. *EMBO J.* 2004;23(3):541-551.
  36. Moya IM, Umans L, Maas E, et al. Stalk cell phenotype depends on integration of notch and smad1/5 signaling cascades. *Dev Cell.* 2012; 22(3):501-514.
  37. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008;27(3):522-534.
  38. Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene.* 2007;26(55):7692-7699.
  39. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, et al. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood.* 2010;116(19):4025-4033.

## Supplementary figures:

### **Supplementary Figure 1: Anti-BMP9 and ALK1ecd treatments inhibit BMP9 circulating activity**

BRE activity from plasma (1/200 dilution) taken from P5 WT pups that were treated with PBS (n=4), anti-BMP9 (n=4) or ALK1ecd (n=2) from two litters. NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)<sub>2</sub>-luc, pRL-TK-luc and ALK1 plasmids. After 4h, diluted plasmas were added for 15h. The luciferase activities were then measured as described in Materials and Methods. Results are presented as BRE activity extrapolated to equivalents of recombinant BMP9 (ng/mL). Error bars show SEM.

### **Supplementary Figure 2: *Bmp9*-KO mice do not express BMP9**

A: BMP9 and HPRT mRNA levels in livers of WT and *Bmp9*-KO pups. B: BMP9 levels were measured from diluted plasma (1/2) taken from WT (n=5) and *Bmp9*-KO (n=5) mice with a BMP9 ELISA. C: BRE activity from plasma (1/200 dilution) taken from WT (n=5) and *Bmp9*-KO (n=5) mice. NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)<sub>2</sub>-luc, pRL-TK-luc and ALK1 plasmids. After 4h, diluted plasmas were added for 15h. The luciferase activities were then measured as described in Materials and Methods. Results are presented as BRE activity. Error bars show SEM.

### **Supplementary Figure 3: Effects of ALK1ecd treatment in *Bmp9*-KO mice on proliferation**

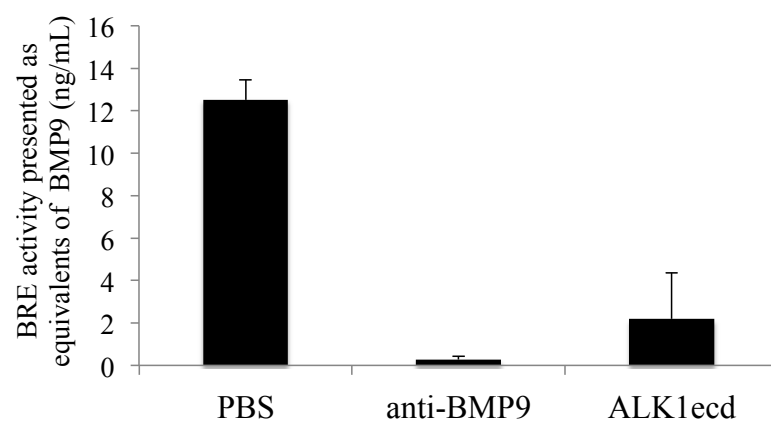
BrdU (red) and isolectin B4 (green) staining of retinas at P5 from *Bmp9*-KO mice treated with PBS (A, B) or ALK1ecd (5 mg/kg, C, D) injected at P1 and P3. A shows an artery and V shows a vein.

### **Supplementary Figure 4: Enlarged vessels in *Bmp9*-KO mice treated with anti-BMP10 antibody**

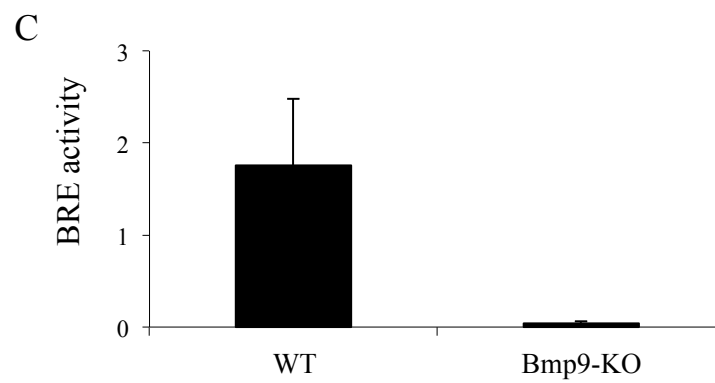
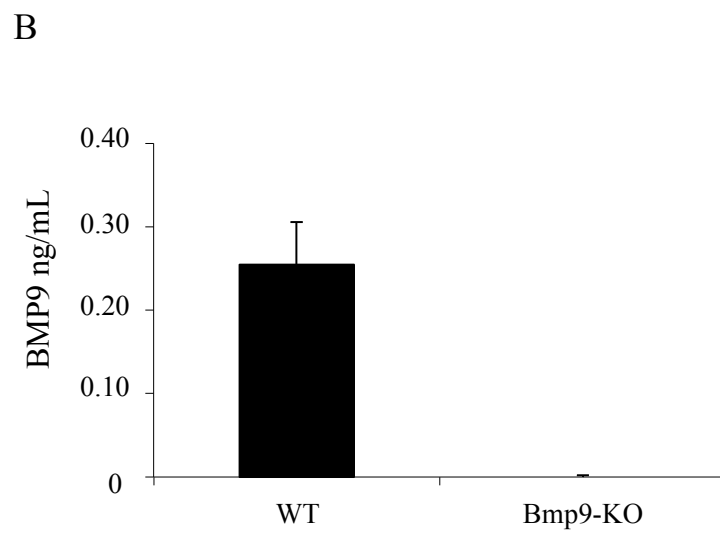
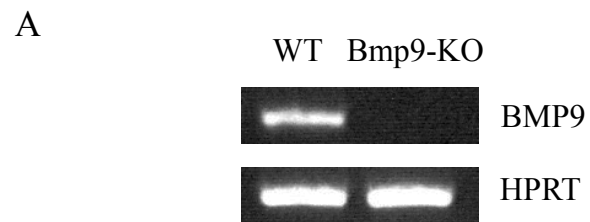
Photographs of the vessels of the neck, the foreleg and the hind leg of *Bmp9*-KO mice at P5 treated with PBS or anti-BMP10 antibody (15 mg/kg at P1 and P3). White arrows indicate vessels.

**Supplementary Figure 5: Multilayered vessels in *Bmp9*-KO retinas treated with anti-BMP10 antibody**

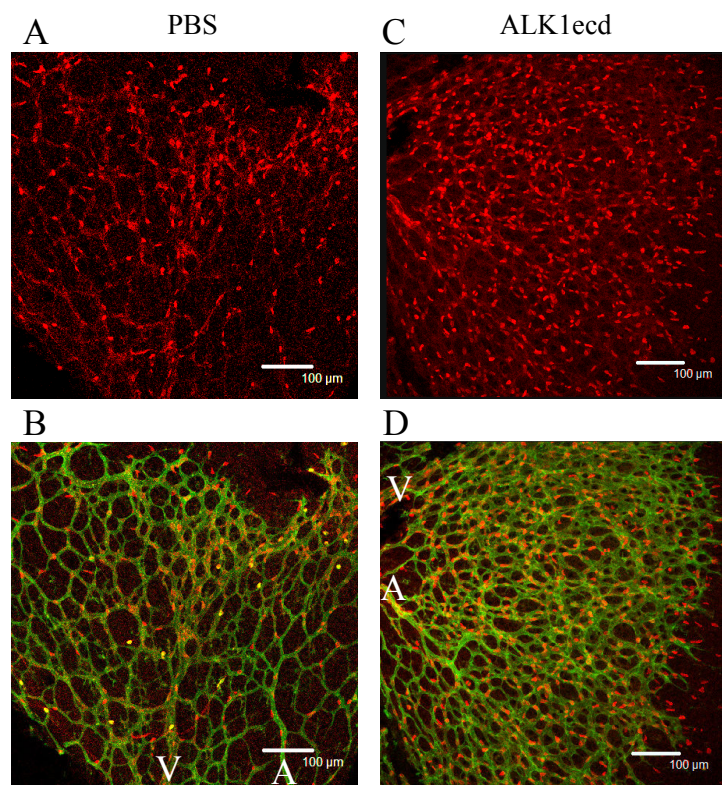
Isolectin B4 (green) staining of retinas at P5 from *Bmp9*-KO mice treated with anti-BMP10 antibody (15 mg/kg) injected at P1 and P3. Confocal images using serial slices (slice 22 (A), slice 29 (B) and slice 36 (C) out of 45 slices) and the snapshot of the 45 images (D). Yellow arrows show a vessel that can be seen in the bottom layer (Figure A, B, D) and white arrows shows another vessel that can only be seen in the upper layer (Figure B, C, D).



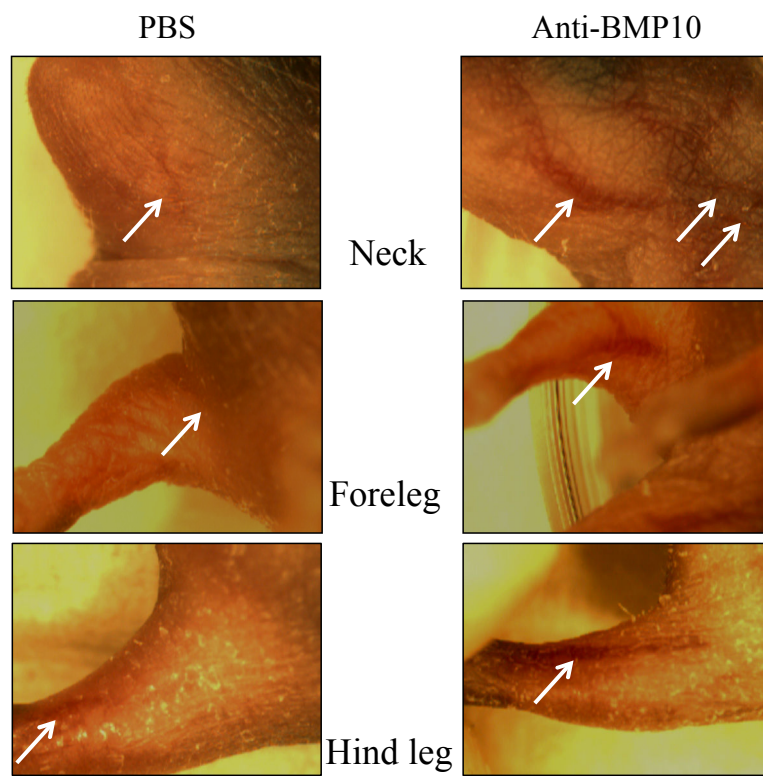
(Ricard et al., Suppl Fig 1)



(Ricard et al., Suppl Fig2 )

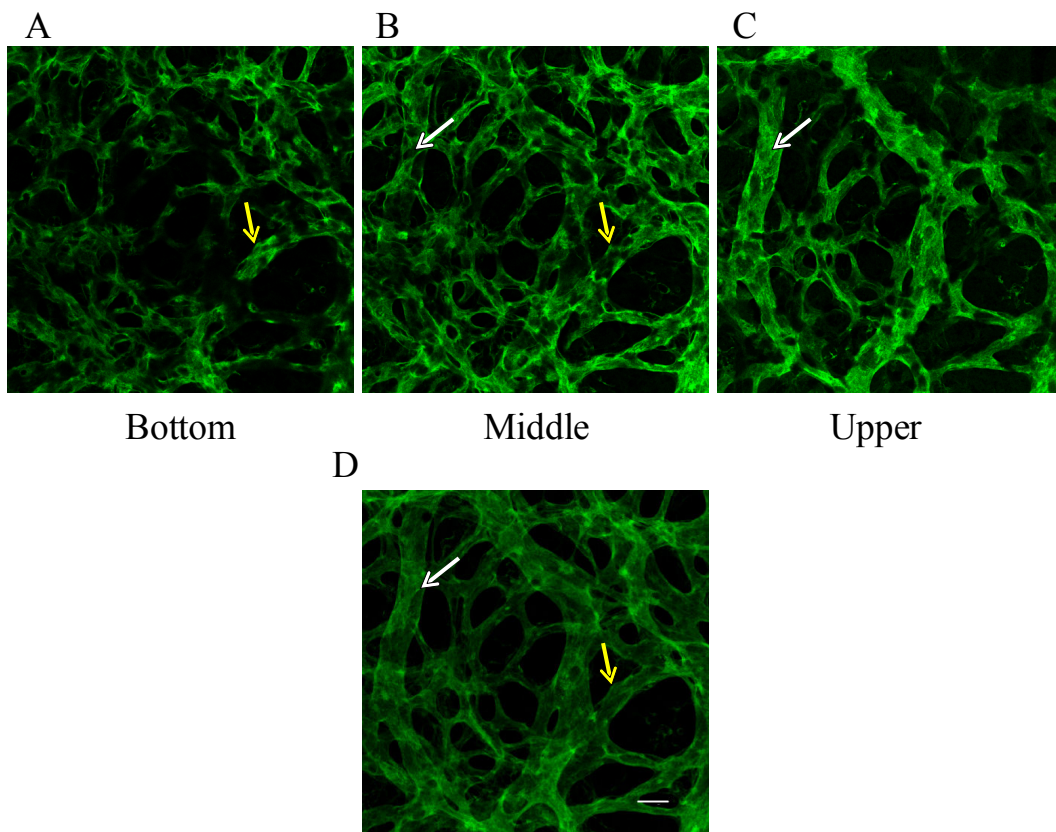


(Ricard et al., Suppl Fig 3)



(Ricard et al., Suppl Fig. 4)





(Ricard et al., Suppl Fig 5)

### 3. Bref résumé de l'article

(1) Les souriceaux *Bmp9*-KO présentent une vascularisation normale de leur rétine, de même que les souriceaux WT traités avec un anticorps anti-BMP10.

(2) En absence de BMP9 et de BMP10, le réseau vasculaire sanguin de la rétine est anormalement hyperdense et ne migre pas en direction des bords de la rétine.

(3) D'un point de vue mécanistique, l'analyse des gènes cibles de BMP9 et de BMP10 a révélé que ces deux protéines régulent de manière identique l'expression de gènes de la voie NOTCH (*Dll4*, *Jag1*, *Hey1*, *Hey2*, *Hes1*), ainsi que le gène de l'Apelone.

### 4. Discussion et perspectives

Ce travail est le premier à évaluer directement l'implication de BMP9 dans l'angiogenèse grâce à l'inactivation du gène de *Bmp9*. Nos données *in vivo* vont dans le sens d'un rôle de BMP9 dans la quiescence de l'endothélium, ce que nous avons auparavant mis en évidence par d'autres approches (migration et prolifération de CE, vascularisation d'implant chez la souris, CAM (David et al., 2008) (David et al., 2007a)).

De manière importante, nos résultats démontrent en plus que BMP10 est capable de compenser l'absence de BMP9. C'est la première fois que BMP10 est dosé dans le plasma murin, BMP10 ayant été auparavant uniquement détecté par une approche transcriptomique dans des sera murins et humains (Souza et al., 2008). Par ailleurs, nos dosages montrent que BMP10 circule à des taux élevés au cours de la période périnatale. En compilant ce résultat avec le dosage de BMP9 réalisé par notre équipe (Bidart et al., 2012), nous montrons que ce sont finalement les 2 protéines qui circulent à des taux élevés au cours de la période périnatale. Cette observation renforce l'idée que BMP9 et BMP10 sont impliqués dans des processus de remodelages vasculaires périnataux.

Les résultats du groupe du Dr. Eichmann, publiés à la même période, vont dans le même sens que les nôtres. Leur approche consiste à inhiber la signalisation ALK1, par une approche virale (adénovirus codant ALK1-Fc injecté à des souriceaux). Cette approche ne leur a pas permis de faire la part des rôles respectifs de BMP9 et BMP10 dans l'hyper vascularisation des rétines qui est observée. Par contre elle leur a permis d'étudier les effets vasculaires de l'inhibition de la voie ALK1 à des temps plus tardifs (P12). A ces stades, l'étude de la vascularisation de la peau de l'oreille leur a permis de détecter des malformations artérioveineuses (Larrivee et al., 2012).

Deux équipes, celles du Dr. Eichman et celle du Dr. Zwijsen ont confirmé *in vivo* et *in vitro* la signalisation croisée ALK1 et NOTCH dans l'angiogenèse (Larrivee et al., 2012) (Moya et al., 2012). Le blocage des 2 voies exacerbe l'hyper vascularisation de la rétine (Larrivee et al., 2012). Moya et ses collaborateurs utilisent l'inactivation de *Smad1* et de *Smad5* dans l'endothélium et étudient l'angiogenèse au niveau de l'aorte dorsale et du cerveau en formation, les invalidations étant létales au cours du développement embryonnaire. Ils démontrent une augmentation du nombre de « tip cells » chez les embryons dont la signalisation BMP est réduite, ce qui était suggéré par l'autre groupe. Ils montrent également que ces « tip cells » perdent leur polarité, ce qui est en accord avec nos observations au microscope confocal qui présentent une augmentation de l'épaisseur du réseau vasculaire de la rétine en parallèle d'une absence de migration dans le plan. Moya et ses

collaborateurs montrent que l'activation de la voie BMP/SMAD1/5 influence la réponse des CE aux stimuli angiogéniques et notamment leur devenir de « tip cell » ou de « stalk cell ».

Finalement, les résultats du groupe du Dr. Zwijsen permettent de comprendre que le phénotype hyperdense que nous observons provient d'une dérégulation de la balance entre « tip cell » et « stalk cells ». La voie de signalisation ALK1, en collaboration avec celle de NOTCH, est nécessaire à la spécification correcte du phénotype des CE. Cette collaboration contrôle l'expression de gènes cibles de la voie NOTCH spécifiquement dans les « stalk cell » (Moya et al., 2012).

La redondance entre BMP9 et BMP10 dans l'angiogenèse a récemment été confirmée par le groupe du Dr. Yan (Genentech) qui a présenté les mêmes expériences que celles que nous avons décrites. En complément de nos résultats, ils décrivent une absence de recouvrement des artères de la rétine par des VSMC et *in vitro*, ils montrent une augmentation du bourgeonnement des HUVEC (Chen et al., 2013). Ces résultats n'apportent que peu de nouveauté par rapport à ce que nous avons décrit, ils sont plutôt le support d'une discussion sur les spécificités de BMP9 et de BMP10, ce qui sera abordé dans la dernière partie de cette thèse.

L'implication de BMP10 dans l'angiogenèse vient d'être décrite dans le modèle du poisson zèbre (« zebra fish »). Dans ce modèle, le flux sanguin est nécessaire non seulement à l'expression de ALK1, mais également à l'activation de ALK1, grâce à la distribution de BMP10 dans l'organisme. Chez le poisson zèbre l'absence de BMP10 récapitule le phénotype de l'absence de ALK1, en terme de vascularisation des artères du crâne (augmentation du nombre de CE et élargissement des vaisseaux). L'absence de BMP9 n'a pas d'effets sur ces aspects, mais elle en aurait sur le remodelage des veines (Laux et al., 2013). L'induction de ALK1 en réponse au flux est un résultat intéressant développé par l'équipe du Dr. Roman, et qui n'a pas été testée en dehors du modèle du poisson zèbre (Corti et al., 2011).

Nos travaux et ceux de Chen et de Laux (Chen et al., 2013) (Laux et al., 2013) ouvrent des perspectives liées à la redondance de BMP9 et de BMP10. Elles seront discutées dans la dernière partie de cette thèse car la redondance de ces deux ligands est un point commun à l'ensemble de ce travail de thèse.

### III. La fermeture du canal artériel

#### 1. Contexte de l'étude

Ce travail sur le DA est un prolongement de celui sur l'implication de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse de la rétine. Dans la précédente partie, nous avons démontré la redondance des 2 protéines en traitant des souriceaux *Bmp9*-KO avec un anticorps anti-BMP10. Ces souriceaux, en plus de leurs défauts de vascularisation de la rétine, présentent un phénotype beaucoup plus sévère : ils ne prennent plus de poids après 2 jours de traitement, présentent des hémorragies pulmonaires et meurent en 4 jours.

Nous avons donc cherché à comprendre les causes de cette mortalité précoce chez les souriceaux *Bmp9*-KO traités avec l'anti-BMP10. Devant les symptômes observés, nous avons émis l'hypothèse d'un défaut de fermeture du DA, ce vaisseau sanguin dont la fermeture est essentielle pour la transition de la circulation fœtale à la circulation néonatale. Notre objectif a donc été de tester si BMP9 et BMP10 étaient impliqués dans la fermeture du DA.

#### 2. Résultats

Les résultats de ce travail vont faire l'objet d'un article dont le manuscrit est en cours de rédaction. Nous allons le soumettre dans « *Circulation Research* ». Le manuscrit présenté ici est donc configuré pour répondre aux exigences de ce journal. J'ai réalisé l'ensemble des expériences *in vivo* de ce travail.

# BMP9 and BMP10 are involved in closure of the ductus arteriosus

Sandrine LEVET<sup>1,2,3</sup>, Emmanuelle TILLET<sup>1,2,3</sup>, Delphine CIAIS<sup>1,2,3</sup>, Marie BIDART<sup>3,4,5</sup>, Charles COUTTON<sup>3,6,7</sup>, Mariela SUBILEAU<sup>1,2,3</sup>, Christine MALLET<sup>1,2,3</sup>, Jean-Jacques FEIGE<sup>1,2,3</sup>, Sabine BAILLY<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Inserm, U1036, Grenoble, F-38054 France;

<sup>2</sup>CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, F-38054 France;

<sup>3</sup>Université Grenoble-Alpes, Grenoble, F-38054 France;

<sup>4</sup>Inserm, U836, Equipe 7 Nanomédecine et Cerveau, BP 170, Grenoble, France

<sup>5</sup>Institut de Biologie et Pathologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Grenoble, France

<sup>6</sup>Laboratoire de Génétique Chromosomique, Département de Génétique et Procréation, Hôpital Couple Enfant, CHU Grenoble, Grenoble, France

<sup>7</sup>Equipe “Génétique, Infertilité et Thérapeutique”, Laboratoire AGIM, CNRS FRE3405, Grenoble, France

Corresponding author: Sabine Bailly, U1036 BCI/CEA, 17 rue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex ; Fax : (33) 438785058 ; tel : (33) 438789214 ; email : [sabine.bailly@cea.fr](mailto:sabine.bailly@cea.fr)

## Abstract (250):

### Rationale:

The two members of the TGF $\beta$  family, BMP9 and BMP10 have been recently shown to be involved in postnatal angiogenesis in a redundant manner. Indeed, although Bmp9-KO pups have a normal retinal vascularization, injection of a neutralizing anti-BMP10 antibody at postnatal day 1 and 3 (P1 and P3) into these animals severely affected retinal vascularization while anti-BMP10 treatment in WT pups had no effect. Interestingly, anti-BMP10 treatment in Bmp9-KO pups also severely affected the growth of these animals, which die between P4 and P5 with hemorrhagic lungs. Taken together these results suggested a problem in closure of the ductus arteriosus (DA), a blood vessel whose closure is essential for the transition from fetal to neonatal circulation.

### Objective:

To test whether BMP9 and BMP10 are involved in the closure of the DA.

### Methods and results:

We show that indeed anti-BMP10 treatment in Bmp9-KO pups leads to a patent DA (PDA). Bmp9 loss-of-function already caused a defect in the thickening of the DA wall around birth, which resulted in an imperfect closure of the DA. We could further demonstrate that anti-BMP10 treatment exacerbated this phenotype, thereby inducing a re-opening of the DA. We show that both cyclooxygenase 2 and hyaluronan synthase 2 are targets of both BMP9 and BMP10. Our results are further supported by human data, as we were able to define a 700-kb minimal critical region in chromosome 2 encoding eight genes including BMP10 that correlated with the presence of a PDA in two patients.

### Conclusions:

These data identify BMP9 and BMP10 as two new candidate genes involved in the physiological closure of the DA.

Keywords: BMP9, BMP10, ductus arteriosus,

### Non-standard Abbreviations and Acronyms:

ALK1: activin receptor-like kinase 1

BMP: bone morphogenetic protein

CNV: copy number variation

COX2: cyclooxygenase 2

DA: ductus arteriosus

EMT: epithelial to mesenchymal transition

endMT: endothelial to mesenchymal transition

HA: hyaluronan

HAS: hyaluronan synthase

HHT: hereditary hemorrhagic telangiectasia

hPAEc: human pulmonary arterial endothelial cell

IC: intimal cells

IEL: internal elastic lamina

MCR: minimal critical region

PAH: pulmonary arterial hypertension

PDA: patent ductus arteriosus

PGE<sub>2</sub> : prostaglandin E<sub>2</sub>

VSMC: vascular smooth muscle cells



Bone morphogenetic Protein 9 (BMP9) and BMP10 are two members of the BMP family that have been shown to bind with high affinity to the type 1 receptor of the TGF $\beta$  family ALK1 (activin receptor-like kinase 1) [1,2]. ALK1 has been demonstrated to be mainly expressed on endothelial cells and mutations of ALK1 have been linked to two vascular diseases, hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) and pulmonary arterial hypertension (PAH). BMP9 and BMP10 have therefore been recently identified as two major players of vascular remodeling [3]. BMP9 was shown to be mainly expressed by the liver while BMP10 is principally produced by the heart but a lower level is also produced by the liver [4-7]. Both BMP9 and BMP10 have been shown to be present in blood and their circulating levels were found particularly high in mice around birth [4,5], suggesting that they could play a role in pre- and postnatal development. Bmp9-deficient mice are viable, but it was recently described severe lymphatic defects in these mice [8]. On the other hand, Bmp10-deficient mice die between embryonic day 9.5 (E9.5) and E10.5 with profound defects in cardiac development [7], which prevented studies of its role on vascular remodeling. However, using a neutralizing anti-BMP10 antibody, we recently demonstrated a redundant and requisite role for BMP9 and BMP10 in post-natal retinal vascularization [5]. Indeed, we recently published that although Bmp9-KO pups have a normal retinal vascularization, injection of a neutralizing anti-BMP10 antibody at post-natal day 1 (P1) and 3 (P3) into these animals severely affected retinal vascularization while anti-BMP10 treatment in WT pups had no effect [5]. These results were very recently confirmed by another group [6]. What we had not shown before is that anti-BMP10 treatment of these pups also severely affected the growth of these animals, which die between P4 and P5 with hemorrhagic lungs. Taken together these results suggested to us that their ductus arteriosus (DA) could be open.

The ductus arteriosus (DA) is a muscular artery derived from the sixth left aortic arch artery that directs blood flow from the pulmonary artery to the aorta, shunting blood away from the embryonic lung. Very rapidly after birth the DA closes in order to divert blood from the right ventricle through the newly expanded lungs. Therefore closure of the DA is an essential step in the transition from fetal to neonatal circulation. Functional DA closure resulting from vasoconstriction begins within minutes of birth and is required for subsequent anatomic closure. Anatomic closure starts before or around birth and finishes within days or weeks after birth depending on the size of the animal. This process will transform the former vessel in the ligamentum arteriosum by a poorly described mechanism. Persistent patency of the DA (PDA) is prevalent in low-birth-weight preterm infants, resulting in pulmonary congestion and failure to thrive. Prostaglandin H synthase inhibitors, such as ibuprofen, can close the DA in approximately 70% of infants; however morbidities are not uncommon. Failure of medical therapy often leads to surgical invasive closure. Conversely, maintenance of DA patency, by prostaglandin E infusion, is sometimes required as a bridge to corrective congenital heart surgery.

The identification of a role for BMP9 and BMP10 in the closure of the DA was the subject of the study. We show here that indeed anti-BMP10 treatment at P1 and P5 in Bmp9-KO pups leads to an open DA. Interestingly, we also found that Bmp9 loss-of-function already caused a defect in the thickening of the DA wall around birth, which resulted in an imperfect closure of the DA and that anti-BMP10 exacerbated this process leading to a reopening of the DA. We identified cyclooxygenase 2 and hyaluronan synthase 2 as targets of both BMP9 and BMP10. Our work is further supported by human data, as we were able to define a 700-kb minimal critical region in chromosome 2 encoding eight genes, including BMP10, that correlates with the presence of a PDA in two patients. Taken together this work identifies two growth factors involved in proper closure of the DA that could enable to propose new therapeutics in case of improper closure of the DA. Genetic analysis of BMP10 and BMP9 could also be important in the diagnostic of PDA.

## Methods

### Mice

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. Heterozygous offspring of chimeras were mated out 9 generations to C57BL6/J as previously described [5]. Anti-human/mouse BMP10 and anti-human/mouse BMP9 monoclonal antibodies (MAB2926 and MAB3209, R&D Systems) were prepared at 6  $\mu$ g/ $\mu$ L and 2 $\mu$ g/ $\mu$ L respectively. Injections were done intraperitoneally (i.p.) in mice at

post-natal day 1 (P1) and day 3 (P3) (15 mg/kg for anti-BMP10 and 5 mg/kg for anti-BMP9) and the mice were sacrificed at P4 or P5. Preterm and term fetuses were delivered by Cesarean section at 16.5 and 18.5 days post coïtum respectively. For the later, corresponding to few hours before natural delivery, pups were sacrificed every hour (until 4 hours) for histological analysis. For angiographic images, Evan's blue 1% was injected intracardially in both ventricles using a 10µL Hamilton syringe and immediately photographed with Zeiss AxioCam Icc1 Camera.

### Microscopy

For transmission electron microscopy, chest cavities of P0 and P4 mice were filled with 2.5% glutaraldehyde with 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) and DA were then dissected and fixed overnight at 4°C. The samples were then post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.15 M sodium cacodylate (pH 7.4) for 1 hour. Sections (70 nm) were collected on a 200-mesh copper grid and stained with 5% uranyl acetate and lead citrate, then viewed on a JEOL 1200 EX transmission electron microscope at 80 KV. Semi thin sections (500nm) were stained with Epoxy Tissue Stain (#14950, EMS). For light microscopy, pups from E18.5 caesarean section and from P0 and P4 were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. Chest cavities were embedded in paraffin, and transverse sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Images were acquired with a Zeiss Axioplan microscope and analyzed using Axiovision 4.8 software.

### Endothelial Cells Culture, treatment and quantitative real time PCR.

Human pulmonary arterial endothelial cells (hPAECs) were obtained from LONZA Biosciences and cultured in EGM-2 medium containing endothelial cell growth supplements with 5% fetal bovine serum. They were used between passage 5 and 7. Cells were stimulated in serum-free medium with 1ng/mL recombinant human BMP9 or BMP10 (R&D Systems) at the different times indicated. Total RNAs were extracted at the indicated times using the Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel). First-strand cDNAs were synthesized from 1 µg total RNA by reverse transcription using the iScript system (Bio-Rad) according to the manufacturer instructions. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using a Bio-Rad CFX96 apparatus and qPCR Master Mix (Promega). Relative quantification of gene expression was normalized to HPRT mRNA expression level. Sequences of the PCR primers are listed below:

HAS1: F: CGGCAAGCGCGAGGTCATGT, R: CACGTCCCCACCAACAGCCC,  
HAS2: F: AGCCTTCAGAGCACTGGGACGA, R: TCTCCCCAACACCTCCAACCA,  
HAS3: F: CAAGGCCCTCGGCGATTTCGG, R: CCCCCGACTCCCCCTACTTGG,  
COX2: F: TAGGAATGTTCCACCCGCAGTACAG, R: CAGCATCGATGTCACCATAGAGTGC  
HPRT: F: ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT, R: TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG.

### Human genomic analysis

Research of individuals carrying copy number variations (CNV) encompassing BMP9 or BMP10 genes was performed in national (AchroPuce) and international databases (DECIPHER, ISCA) of patients and healthy controls (DGV) analyzed by array-CGH. For each patient with a CNV, detailed clinical features were obtained directly from the corresponding clinical geneticist.

### Statistical analysis.

Statistical data analysis was assessed using Mann Whitney test.

### Results

#### **Injection of antibodies directed against BMP10 in Bmp9-KO pups leads to a patent ductus arteriosus:**

We have recently published that although Bmp9-KO pups have a normal retinal vascularization, injection of a neutralizing anti-BMP10 antibody at post-natal day 1 (P1) and 3 (P3) into these animals severely affected retinal vascularization while anti-BMP10 treatment in WT pups had no effect [5]. Interestingly anti-BMP10 treatment also resulted in a significant decrease of the overall size of these mice (Fig. 1A), and led to premature death at P4 or P5. These pups stopped gaining weight at P3 (Fig.

1B) but this was not due to a loss of feeding, as milk could be observed in their stomach. Histological analysis of lungs of these pups indicated hemorrhages into the alveolar spaces (Fig. 1C). Taken together these symptoms reminded us to what can be observed in mice with a patent ductus arteriosus (PDA) [9,10]. We therefore looked at the DA of these pups at P5 by angiography after Evans blue injection. We found that Bmp9-KO pups treated with control IgG had a closed DA while Bmp9-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies had an open DA (Fig. 1D). This was further confirmed looking at Hematoxylin and Eosine (H&E) stainings of transverse sections of the DA at P5 (Fig. 1E). None of these effects were observable in WT pups treated with anti-BMP10 antibodies (Suppl. Fig 1A, 1B, 1C).

#### **BMP9 inactivation leads to an abnormal closure of the DA at P4:**

Looking at the cellular organization of the center of the DA at higher magnification through semithin sections and electron microscopy images at P4 revealed other interesting points (Figure 2). As previously described by Tada et al. [11], the center of the DA of WT pups was filled by “intimal cells”. The term intimal cells (IC) was used to include both endothelial cells and subendothelial intimal cells because it is difficult to differentiate exactly between the former and the latter. These cells were surrounded by the internal elastic lamina (IEL, tortuous dark blue ribbon) that was surrounded by several layers of vascular smooth muscle cells (VSMC) (Figure 2A). As expected, the DA of Bmp9-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody was open (Figure 2A). Red blood cells and islets of intimal cells could be detected in the lumen and interestingly this lumen was lined by a layer of flattened EC cells again surrounded by the IEL and VSMC (Figure 2B). Islets of IC cells were also sometimes observed within the lumen. Surprisingly, similar features were observed in untreated Bmp9-KO pups. The lumen was not completely closed, red blood cells could be detected, in some areas flat EC surrounding the lumen could be observed and in other areas IC could be observed (Figure 2B). Measuring the overall diameter of the DA demonstrated that it was significantly increased in Bmp9-KO treated pups versus WT pups or untreated Bmp9-KO pups (Figure 2C) suggesting a defect in DA constriction. Taken together, these results show that while Bmp9-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody resulted in an open DA, Bmp9-KO pups also presented anomalies in the closure of the DA and that injection of an anti-BMP10 antibody exacerbated this phenomenon.

#### **BMP9 inactivation leads to a defect in the DA wall thickening at birth:**

As we observed an improper closure of the DA at P4 in Bmp9-KO pups, we wanted to see what happens at earlier time-points when the DA closes around birth. DA closure process in mice has been described to start before birth and closure is observed within a matter of 1-3 hours after birth [11]. We first performed a kinetic analysis of DA closure in WT versus Bmp9-KO pups. To do this, caesarian section at 18.5 days of gestation, that corresponds to a few hours before natural delivery were performed and pups were euthanized every hour. We observed a similar kinetic of closure for these pups. By three hours, the DA was closed in both WT and Bmp9-KO pups as shown in Figure 3A. Intimal thickening is an important feature in the process of DA closure, which starts at birth in mice [11,12]. We therefore measured the thickness of the DA wall at E16.5, immediately after caesarian section (t=0h) and one hour later (t=1h). While no differences could be detected between WT and Bmp9-KO pups at E16.5 and t=0 h, a significant decrease in the wall width was observed at t=1 hour in Bmp9-KO versus WT pups (Fig. 3B and C). We next analyzed the DA of newborn pups in the afternoon of their birth, referred as P0. Again the thickness of the DA was significantly reduced in Bmp9-KO pups versus WT pups (Fig. 3D and E). In contrast, semithin sections and electron microscopy images of the center of the DA at P0, did not show obvious differences in WT versus Bmp9-KO pups (Suppl. Fig 2); the center of the DA was filled by IC which were cuboidal and arranged densely and compactly as previously described [11].

#### **BMP9 and BMP10 upregulate cyclooxygenase 2 and hyaluronan synthase 2 expressions:**

Intimal thickening has been described to be mainly due to an increase in hyaluronan (HA) under the control of prostaglandins [13]. It was described that activated endothelial cells of the DA both produce HA and trigger SMC to produce this substance as well. We therefore looked whether hyaluronan synthases (HAS) and cyclooxygenase 2 (Cox2), which was described to be the major enzyme for

prostaglandin production in the DA [14], could be targets of BMP9 or BMP10 in endothelial cells. To do this, human pulmonary arterial endothelial cell (hPAECs) were stimulated with BMP9 or BMP10 (10ng/mL) for different times and their mRNA levels for HAS and Cox2 were analyzed. We found that BMP9 and BMP10 strongly increased Cox2 mRNA levels (Fig. 3F). HA is synthesized by 3 isoforms of HAS (HAS1, HAS2 and HAS3) so we therefore studied their mRNA expression. HAS1 mRNA was not detected in endothelial cells (data not shown), whereas HAS2 and HAS3 were present. HAS2 mRNA was significantly increased (around 5 fold) by BMP9 and BMP10 treatment while HAS3 expression was not regulated (Fig. 3G and H).

#### **BMP10 gene deletion is linked to PDA in human:**

Patent DA in newborns is a real medical problem [15]. Several genes have been linked to PDA [16]. We therefore looked whether patients with PDA would present a chromosomal deletion of BMP9 or BMP10. To do this, research was performed in national and international databases of patients (AchroPuce, DECIPHER, ISCA) and healthy controls (DGV) analyzed by CGH-array, in order to identify individuals carrying copy number variation (CNV) including BMP9 or BMP10 genes. The information gathered in the DGV database showed the presence of many polymorphic CNVs (heterozygous deletion and duplication) including BMP9 gene. These preliminary data suggest that haploinsufficiency of the BMP9 gene are not directly involved in a specific disease. In contrast, no polymorphic CNVs including BMP10 were found. Moreover, two patients had a large heterozygous deletion including totally the BMP10 gene (Figure 4). In both cases, a PDA was reported in the clinical features. In patient 1, a 4.6Mb-deletion was detected encompassing 28 known protein-coding. In patient 2, a 7Mb-deletion including about 75 genes was detected. Six other patients, with several deletions overlapping these two previous anomalies, but without including BMP10, did not show any cardiac abnormality (no PDA). By collecting all these data, we were able to define a 700-kb minimal critical region (MCR) correlated with the presence of a PDA. This MCR included BMP10 among seven other genes (APLF, PLEK, FBX048, GKN2, PROKR1, CNRIP1, ARHGAP25). The results of human genetics provide an additional argument on the involvement of BMP10 in the physiopathology of the PDA.

#### **Discussion**

This study identified for the first time a critical role for BMP9 and BMP10 in the closure of the DA. Although Bmp9-KO mice are viable, looking at their DA around birth demonstrated that their DA will close, despite a significantly thinner DA wall in these pups versus WT pups. In accordance with this observation, injection of a neutralizing anti-BMP10 antibody at P1 and P3 in these pups led to a re-opening of the DA while it had no effect in WT pups. Interestingly, injection of anti-BMP9 and anti-BMP10 antibodies at P1 and P3 in WT pups did not induce reopening of the DA (Suppl. Fig 1D and E) further supporting that the process which leads to an imperfect closure of the DA takes place at earlier time points, before birth. Injection of anti-BMP10 antibodies at E16 in Bmp9-KO dams did not lead to viable pups (data not shown) and therefore the status of the DA could not be analyzed under these conditions. These data support a redundant role of BMP9 and BMP10 in the closure of the DA. In accordance with these data, we demonstrated that Cox2 and Has2 are two molecular targets for both BMP9 and BMP10. The role of these BMPs was further supported by our human genetic analyses. Indeed, we identified a MCR of 700 kb deleted in two patients with PDA that included the entire BMP10 gene.

The DA is a unique blood vessel linking the pulmonary and systemic circulation in utero. It is derived from the left sixth aortic arch and its VSMC have a neural crest origin. The DA shunts blood away from the lungs during fetal life, but at birth this shunt is no longer needed and the vessel rapidly constricts. Postnatal persistence of the DA is predominantly a detrimental condition for preterm infants. DA closure has been described to occur in 2 phases. During the first few hours after birth occurs a functional closure which is an acute and provisional closure resulting from smooth muscle contraction of the DA. It is triggered by an increase in oxygen tension and a decline in levels of

circulating PGE<sub>2</sub>, which is a vasodilator. The second phase, the transformation of the former vessel into a ligament, is termed anatomical closure and correspond to a definitive closure. PGE<sub>2</sub> have also been described to play a role in this phase via the production of HA before and around birth for proper intimal thickening [13]. Among species, there is a high degree of variability concerning the extent of this intimal thickening that takes place before or just after birth, and which mainly depends on the size of the animal [12]. Small animals, including chicken, rat, mouse and rabbit show no intimal cushion formation prior to DA constriction [11].

Measuring the DA wall width at E16, just after the caesarian section (t=0h) and one hour later, we confirmed here that DA wall thickening in mice significantly increases one hour post-birth (Fig. 3B) and continue to increase at least until P0. We also measured the width of the subendothelial region and of the media corresponding to the different layers of VSMC in Bmp9-KO pups versus WT pups but did not found any differences between the two groups (data not shown). Thus we concluded that Bmp9 loss-of-function led to a general decrease in the width of the DA. Several glycoproteins and glycosaminoglycans have been tested for their roles in intimal thickening of the DA. The Hyaluronic acid (HA) was the one that increased the most and interestingly it was shown that activated endothelial cells of the DA both produced and triggered SMC to produce HA [17,18]. Three known HA synthases (HAS1, HAS2, HAS3) produce HA polymers of varying lengths and expression of these three isoforms is cell- and tissue-specific [19]. In accordance to a previous work in HUVEC [20], we only detected HAS2 and HAS3 mRNA in human pulmonary arterial endothelial cells. We could show that BMP9 and BMP10 specifically and significantly regulated HAS2 but not HAS3 (Fig. 3G and H). HAS2 expression has been shown to be strongly induced in response to PGE<sub>2</sub> via the receptor EP4 [13]. PGE<sub>2</sub> are produced by prostaglandin-endoperoxidase synthase 1 and 2, also known as cyclooxygenase 1 and 2 (Cox-1 and Cox2). Cox2 has been described as the most important in closure of the DA. Its deletion leads to 35-57% death shortly after birth as a result of a PDA although mortality and incidence of PDA was increased when one copy of Cox1 was also inactivated [14]. We could show that BMP9 and BMP10 also strongly induced the expression of Cox2 mRNA expression (Fig. 3F). Our working model is thus that in absence of BMP9 there is a decrease in HAS2 and Cox2 expressions that leads to a decrease in HA, which will reduce DA widening after birth.

Importantly, we show here that addition of anti-BMP10 antibodies at P1 and P3 will induce a reopening of the DA in Bmp9-KO pups but not in WT pups. These results suggest that BMP9 and BMP10 are necessary in the process of anatomical closure proceeding after birth. This process is much less documented and results from extensive remodeling of the DA wall, which leads to permanent closure of the DA. In mice, ultrastructure analysis showed that intimal cells that were arranged densely and compactly at birth became gradually dissociated from one another and were surrounded by elastic fibers [11]. At first, the formation of these elastic fibers was noted at the periphery of the intima, and later in the center. In the present work, we observed similar features in WT pups between P0 and P4 (Suppl. Fig. 2 and Fig. 2A and B). This process seemed to be defective in Bmp9-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies. Indeed, although at P0 the flattened EC had become cuboidal IC as in WT pups (Suppl. Fig. 2); at P4, we saw flattened endothelial cells tightly attached to each other that surrounded the lumen as could be seen in a DA before closure (Fig. 2A and B). Islets of cuboidal IC could still be detected in some areas of the lumen. P4 untreated Bmp9-Ko pups had an intermediate phenotype with some IC surrounded by elastic fibers and some flattened EC (Fig. 2A and B). Taken together these results suggested that absence of BMP9 and BMP10 in these pups would block this process and thus these IC would come back to their initial stage of flattened EC. This process of differentiation of EC into IC producing extracellular matrix proteins and elastic like fibers resembles the process of endothelial to mesenchymal transition (endMT), a process that has been mostly described in cardiac valve formation. TGFβ and BMPs have been shown to be involved in endMT and epithelial to mesenchymal transition (EMT) [21,22]. Although TGFβ is clearly a key player in EMT and endMT via expression of many extracellular proteins, the role of BMPs is still not clearly understood. BMP7 has been shown to be a potent inhibitor of endMT during formation of the atrioventricular cushion [23] although another work described that BMP6 and BMP7 are necessary for cardiac cushion formation [24]. BMP2 and BMP4 have also been described to induce EMT and endMT [25,26]. Interestingly, BMP9 was recently shown to induce EMT transition in hepatocellular

carcinoma cells [27]. From these data we could propose that in absence of BMP9 and BMP10, endMT is blocked and that the DA re-opens. Further work will be necessary to test this novel hypothesis.

After birth, the DA diameter narrows until forming a very thin ligament. The DA diameter in *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies was significantly bigger than in WT pups at P4 (Fig. 2C). Therefore another possible explanation for the reopening of the DA would be a defect in this process that would not allow the maintenance of a pressure on the center of the DA and thus in response to blood pressure the DA would return to its previous open stage. The molecular mechanisms involved on this process are completely unknown and much more work will be necessary to challenge this hypothesis.

PDA in human infants can be divided into two groups; a relatively rare condition seen in term infants that exist as part of a constellation of other physical anomalies and a common condition present in very preterm infants that would not be present if these infants had been born at term. Several genetic studies have focused on PDA associated with syndromes often excluding preterm infants. Mutations in *MYH11*, a gene encoding smooth muscle myosin heavy chain 11, and in smooth muscle  $\alpha$ -actin (*ACTA2*) have been identified in the syndrome of thoracic aneurysm and PDA [28,29]. In accordance, *myh11*<sup>-/-</sup> mice have a delayed closure of the DA, but full closure will occur [10]. Mutations in the gene *TFAP2B* have also been found to result in Char syndrome, a rare disorder characterized by facial dysmorphism, hand anomalies, and PDA [30,31]. Gene polymorphisms associated with PDA in preterm infants have also been recently described [15]. In the present study, our genetic analysis in national and international databases showed the presence of many polymorphic CNVs (heterozygous deletion and duplication) in *BMP9* gene but not in *BMP10*. We therefore focused on *BMP10* and found two patients with a PDA that allowed us to define a 700-kb minimal critical region (MCR) including *BMP10* among seven other genes (*APLF*, *PLEK*, *FBX048*, *GKN2*, *PROKR1*, *CNRIP1*, *ARHGAP25*). These results provided an additional argument on the involvement of *BMP10* in the physiopathology of the PDA. However, these encouraging results require confirmation and further molecular analyses of the *BMP10* gene in a larger cohort of patients with a PDA.

Targeted genetic manipulations have made the mouse an ideal system in which to investigate genes involved in closure of the DA. Deletion of genes related to transcription controls (*Tcfap2b*, *Brg1*-a and *Myocd*) have been linked to PDA [15]. Interestingly, *myocardin* and *Brg1* are two transcription factors that have been shown to be potent regulators for *BMP10* [7,32,33] further supporting a link between PDA and *BMP10*.

So far, all the mouse gene-targeting models that led to a PDA encompass genes involved in functional closure either in the prostaglandin pathway (*Cox2*, *Ptger4*) or in vascular smooth muscle contraction and differentiation (*Myh11*, *Jag1*). In this report, we describe for the first time a model where the DA closes and then re-opens that might allow us to decipher the process of anatomical closure. The only example to our knowledge of a reopening of the DA was described in cases of bacterial infection, suggesting that infection might also deregulate the pathways involved in this anatomical closure [34]. It will be interesting in the future to test a possible link between the BMP pathway and bacterial infection for PDA reopening.

We have previously shown that both *BMP9* and *BMP10* are present in blood and that their circulating levels are much higher around birth suggesting a potential role for them in perinatal vascular remodeling. Very recently, we showed that *Bmp9* loss-of-function impaired lymphatic maturation demonstrating that *BMP10* cannot compensate for *BMP9* in this case [5]. Inversely, it was shown that loss of *BMP10* could not be compensated for cardiac development [6,7]. These studies revealed context-dependent role of *BMP9* and *BMP10*. However, when looking at blood vessel maturation this does not seem to be the case as we showed that for retinal vascularization *BMP9* and *BMP10* are redundant [5] and this was recently confirmed by another group [6]. As presented in this study, this also seems to be the case also for proper closure of the DA. Our genetic analyses favour a role of *BMP10* in PDA however further experiments will be needed to clearly identify their respective roles in human. It will be interesting in the future to measure circulating levels of *BMP9* and *BMP10* in



term and preterm infants in order to see if there is an increase in these two factors around birth as in the mouse, and if we can correlate the circulating levels of these BMPs with PDA.

The processes of separation of endothelial cells from their basal lamina and neointimal cushion formation are required for closure of the DA when it constricts in newborns, but constitute endothelial damage elsewhere. Therefore, a better understanding of the mechanisms governing this physiologic endothelial damage in the perinatal DA might not only provide deeper insights into the pathophysiology of patent DA, but also of other vascular diseases such as pulmonary arterial hypertension and atherosclerosis [35,36]. Familial PAH has been linked to mutations of BMPR2 and ALK1, the type 2 and type 1 high affinity receptors for BMP9 and BMP10 [37]. Therefore, although triggering events of intimal thickening may differ between hypertension and normal DA closure, the morphological similarities in the two cases could suggest common mechanisms.

Taken together these data demonstrate that 1) BMP9 is necessary for a proper closure of the PDA, although in its absence the DA will still close and the pups will be fine; and that 2) the absence of BMP10 together with the absence of BMP9 will irreversibly block the proper closing of the DA. These results demonstrate for the first time, the role of two circulating growth factors in the closure of the DA. This work will undoubtedly open the way of new potential therapeutic developments in PDA.

## Figures Legends

### **Figure 1: Bmp9-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies present a patent ductus arteriosus at P5.**

Bmp9-KO pups were treated at P1 and P3 with control immunoglobulin (IgG) or an anti-BMP10 antibody (15mg/kg) and sacrificed at P5. (A) Representative photographs of 2 littermate Bmp9-KO pups at P5. (B) Typical weight curve of a Bmp9-KO litter from P1 to P5 (n=3 pups in each group, error bars show SEM). (C) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of Bmp9-KO pups' lungs. Scale bar: 200  $\mu$ m. (D) Representative angiographic images after Evan's Blue injection of the cardiac outflow tract, the great arteries and the DA. IA: innominate artery, LCCA left common carotid artery, LSCA: left subclavian artery, PA pulmonary artery. Scale bar: 0.5 mm (E) H&E-stained transverse sections of the DA. Scale bar: 100  $\mu$ m.

### **Figure 2: Abnormal closure of the DA in Bmp9-KO pups at P4.**

WT pups and Bmp9-KO pups were treated at P1 and P3 with control immunoglobulin (IgG) or an anti-BMP10 antibody (15mg/kg) and sacrificed at P4. (A) Representative semithin transverse sections of the DA. For all panels, the areas in the boxes are shown at higher magnifications in the neighboring images beneath. The center of the DA was filled with intimal cells (IC), encircled by the internal elastic lamina and (IEL) surrounded by several layers of vascular smooth muscle cells (VSMC). Scale bar: 20 $\mu$ m. (B) Representative transmission electron microscopy (TEM) images of transverse sections of the DA center. Scale bar: 2 $\mu$ m. TEM images are chosen at the interface between the IEL and ICs or ECs. RBC: red blood cells, EC: endothelial cells, MD: matrix deposition, BL: basal lamina. (C) Quantification of the diameter of the DA, as outlined by the double arrow-line in (A), in WT pups treated with IgG (n=8), and Bmp9-KO pups treated with IgG (n=6) or with anti-BMP10 (n=7). \*\*\*P $\leq$ 0.001, \*\*P $\leq$ 0.01 significantly different by Mann Whitney test. Error bars show SEM.

### **Figure 3: Thickening defect in DA in Bmp9-KO at P0 that could be linked to COX2 and HAS2 genes upregulation by BMP9 and BMP10.**

(A) Representative angiographic images of the DA (arrowhead) after Evan's Blue injection in the ventricles after caesarian section at term (E18.5, t=0h) and 3 hours later (t=3h) in WT and Bmp9-KO pups. Scale bar 500  $\mu$ m. (B) H&E-stained longitudinal sections of the DA of WT and Bmp9-KO pups 1 hour after caesarian section (E18.5). Scale bar: 100 $\mu$ m. (C) Quantification of the thickness of the DA

wall as outlined by the double arrow-line in (B) in WT and Bmp9-KO pups at E16, just after caesarian section at term (E18.5, t=0h) and 1 hour later (t=1h) (WT, n=7, n=4, n=3 and Bmp9-KO, n=5, n=5, n=3, respectively). (D) H&E-stained transverse sections of the DA of WT and Bmp9-KO pups at P0. Scale bar: 100µm. (E) Quantification of the diameter of the DA in WT and Bmp9-KO pups as outlined by the double arrow-line in (D) (n=6 in each group). (F, G, H) mRNA fold changes of COX2, HAS2 and HAS3 expression in hPAEcs stimulated with BMP9 or BMP10 (10ng/mL) in serum-free conditions for the indicated times (1, 2, 4, and 8 hours). Expression of HPRT was used as the normalization control. The results are represented as mRNA fold changes measured in BMP9-treated cells versus untreated cells at each time point. Data are the mean  $\pm$ SEM from 3 independent experiments performed in duplicate. Error bars show SEM in graphics C, E, F, G, H. \*\*P $\leq$ 0.01 and \*P $\leq$ 0.05 significantly different by Mann Whitney test.

**Figure 4: BMP10 gene deletion is associated with Patent Ductus Arteriosus in human.**

Schematic representation of the human chromosome region 2p13.3-2p14 using the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Upper panel: Ideogram of the chromosome region 2p13.3-2p14 with the physical positions of the genes. Lower panel: All CNVs in this region reported in literature are represented with solid black bars. The 700-kb minimal critical region (MCR) correlated with the presence of a PDA is emphasized by dashed lines. The candidate genes included in this MCR are brought out.

**Supplementary figure 1: Histological analysis of DA WT pups at P5 treated with anti-BMP10 and anti-BMP9.**

WT pups were treated at P1 and P3 with control immunoglobulin (IgG) or an anti-BMP10 antibody (15mg/kg) or with a mixture of anti-BMP10 and antiBMP9 (15mg/kg and 5 mg/kg respectively) and sacrificed at P5. (A and D) Representative angiographic images of the DA after Evan's Blue injection in the ventricle. Scale bar: 500 µm. (B and E) H&E-stained transverse sections of the DA. Scale bar: 100 µm. (C) Typical weight curve of a WT litter, 3 pups treated with IgG, 2 with an anti-BMP10 antibody and 1 with both antibodies. Error bars show SEM.

**Supplementary figure 2: Histological analysis of DA at P0**

(A and C) Representative semithin transverse sections of the DA of WT and Bmp9-KO pups at P0. Scale bar: 20µm. The areas in the boxes are shown at higher magnifications in the neighboring images on the right. (B and D) Representative transmission electron microscopy (TEM) images of transverse sections of the DA center. Scale bar: 5µm. TEM images are chosen at the interface between the IEL and ICs.

**References**

1. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109: 1953-1961.
2. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, et al. (2007) BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* 120: 964-972.
3. David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, et al. (2008) Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res* 102: 914-922.
4. Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, et al. (2012) BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci* 69: 313-324.
5. Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, et al. (2012) BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* 119: 6162-6171.

6. Chen H, Brady Ridgway J, Sai T, Lai J, Warming S, et al. (2013) Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
7. Chen H, Shi S, Acosta L, Li W, Lu J, et al. (2004) BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* 131: 2219-2231.
8. Levet S, Ciais D, Merdzhanova G, Mallet C, Zimmers TA, et al. (2013) Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*.
9. Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, Hicks E, Coffman TM, et al. (1997) The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390: 78-81.
10. Morano I, Chai GX, Baltas LG, Lamounier-Zepter V, Lutsch G, et al. (2000) Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin. *Nat Cell Biol* 2: 371-375.
11. Tada T, Kishimoto H (1990) Ultrastructural and histological studies on closure of the mouse ductus arteriosus. *Acta Anatomica* 139: 326-334.
12. Bergwerff M, DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC (1999) Comparative anatomy and ontogeny of the ductus arteriosus, a vascular outsider. *Anatomy and Embryology* 200: 559-571.
13. Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, et al. (2006) Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 116: 3026-3034.
14. Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, Clark JA, Lee CA, et al. (2001) Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1059-1064.
15. Stoller JZ, Dem Mauro SB, Dagle JM, Reese J (2012) Current Perspectives on Pathobiology of the Ductus Arteriosus. *J Clin Exp Cardiol* 8.
16. Hajj H, Dagle JM (2012) Genetics of patent ductus arteriosus susceptibility and treatment. *Seminars in Perinatology* 36: 98-104.
17. De Reeder EG, Girard N, Poelmann RE, Van Munsteren JC, Patterson DF, et al. (1988) Hyaluronic acid accumulation and endothelial cell detachment in intimal thickening of the vessel wall. The normal and genetically defective ductus arteriosus. *Am J Pathol* 132: 574-585.
18. Boudreau N, Turley E, Rabinovitch M (1991) Fibronectin, hyaluronan, and a hyaluronan binding protein contribute to increased ductus arteriosus smooth muscle cell migration. *Dev Biol* 143: 235-247.
19. Sadowitz B, Seymour K, Gahtan V, Maier KG (2012) The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Journal of Surgical Research* 173: e63-72.
20. Vigetti D, Genasetti A, Karousou E, Viola M, Moretto P, et al. (2010) Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway. *J Biol Chem* 285: 24639-24645.
21. Medici D, Kalluri R (2012) Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Seminars in Cancer Biology* 22: 379-384.
22. Goumans MJ, van Zonneveld AJ, ten Dijke P (2008) Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis? *Trends in Cardiovascular Medicine* 18: 293-298.

23. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, et al. (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine* 13: 952-961.
24. Kim RY, Robertson EJ, Solloway MJ (2001) Bmp6 and Bmp7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart. *Dev Biol* 235: 449-466.
25. Ma L, Lu MF, Schwartz RJ, Martin JF (2005) Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development* 132: 5601-5611.
26. McCulley DJ, Kang JO, Martin JF, Black BL (2008) BMP4 is required in the anterior heart field and its derivatives for endocardial cushion remodeling, outflow tract septation, and semilunar valve development. *Developmental Dynamics* 237: 3200-3209.
27. Li Q, Gu X, Weng H, Ghafoory S, Liu Y, et al. (2013) Bone morphogenetic protein-9 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 104: 398-408.
28. Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, Lalande A, Boisset N, et al. (2006) Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet* 38: 343-349.
29. Guo F, Li Z, Song L, Han T, Feng Q, et al. (2007) Increased apoptosis and cysteinyl aspartate specific protease-3 gene expression in human intracranial aneurysm. *J Clin Neurosci* 14: 550-555.
30. Satoda M, Pierpont ME, Diaz GA, Bornemeier RA, Gelb BD (1999) Char syndrome, an inherited disorder with patent ductus arteriosus, maps to chromosome 6p12-p21. *Circulation* 99: 3036-3042.
31. Mani A, Meraji SM, Houshyar R, Radhakrishnan J, Mani A, et al. (2002) Finding genetic contributions to sporadic disease: a recessive locus at 12q24 commonly contributes to patent ductus arteriosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15054-15059.
32. Huang J, Elicker J, Bowens N, Liu X, Cheng L, et al. (2012) Myocardin regulates BMP10 expression and is required for heart development. *J Clin Invest* 122: 3678-3691.
33. Hang CT, Yang J, Han P, Cheng HL, Shang C, et al. (2010) Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* 466: 62-67.
34. Gonzalez A, Sosenko IR, Chandar J, Hummler H, Claude N, et al. (1996) Influence of infection on patent ductus arteriosus and chronic lung disease in premature infants weighing 1000 grams or less. *Journal of Pediatrics* 128: 470-478.
35. Reynolds AM, Holmes MD, Danilov SM, Reynolds PN (2012) Targeted gene delivery of BMP2 attenuates pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 39: 329-343.
36. Kim M, Choi SH, Jin YB, Lee HJ, Ji YH, et al. (2013) The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *International Journal of Radiation Biology* 89: 356-363.
37. Montani D, Gunther S, Dorfmueller P, Perros F, Girerd B, et al. (2013) Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* 8: 97.

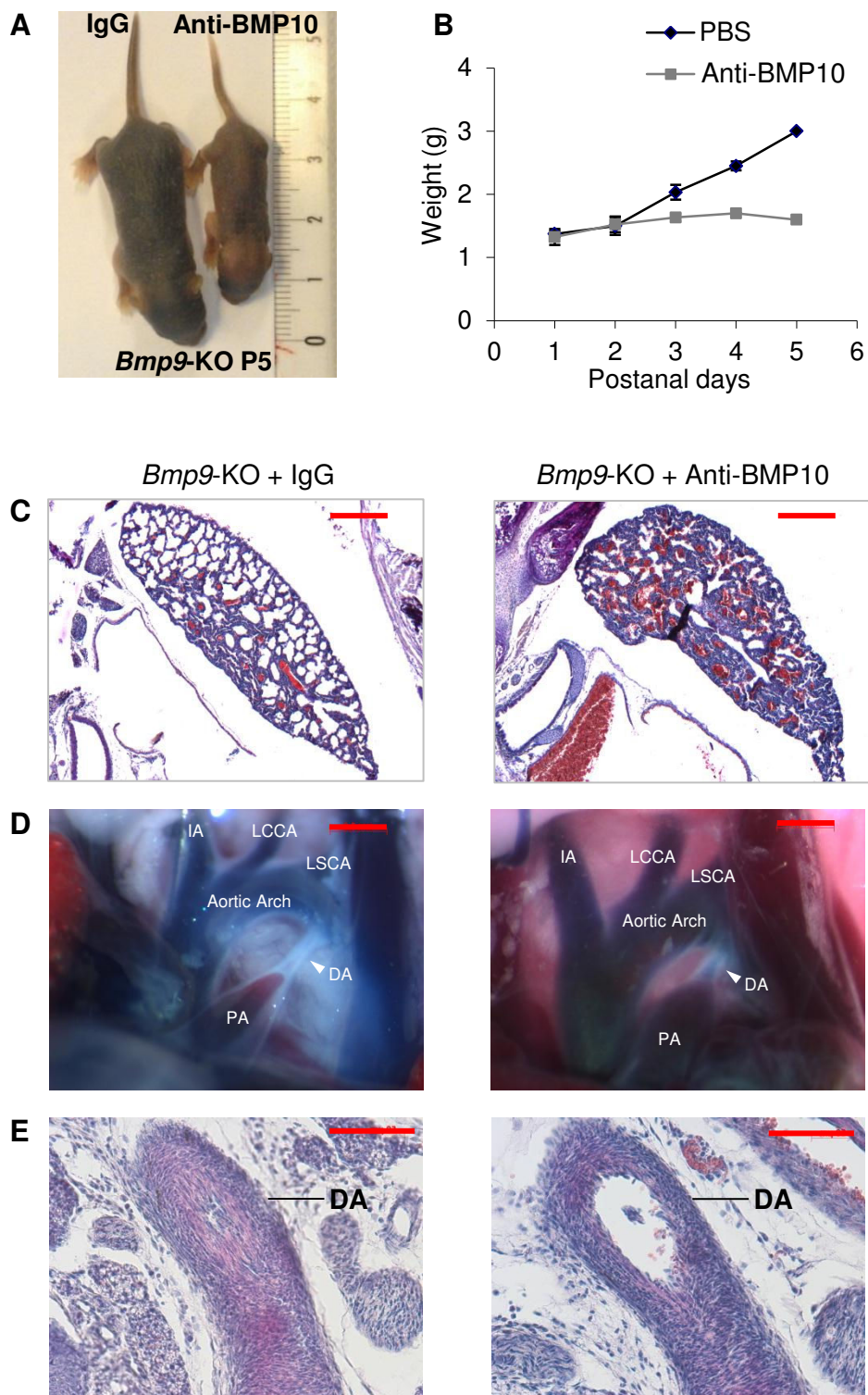


Figure 1 S.Levet

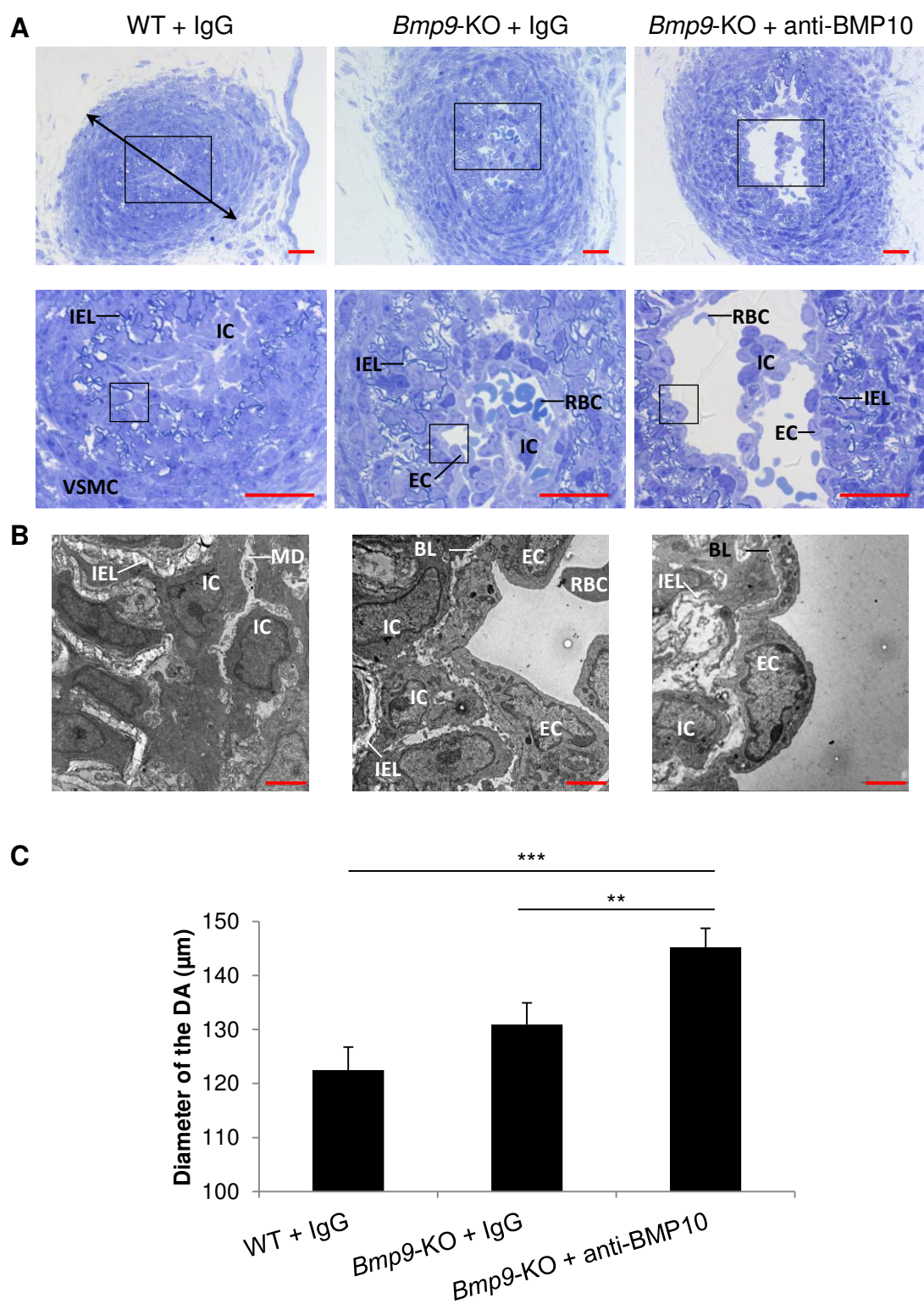


Figure 2 S.Levelt



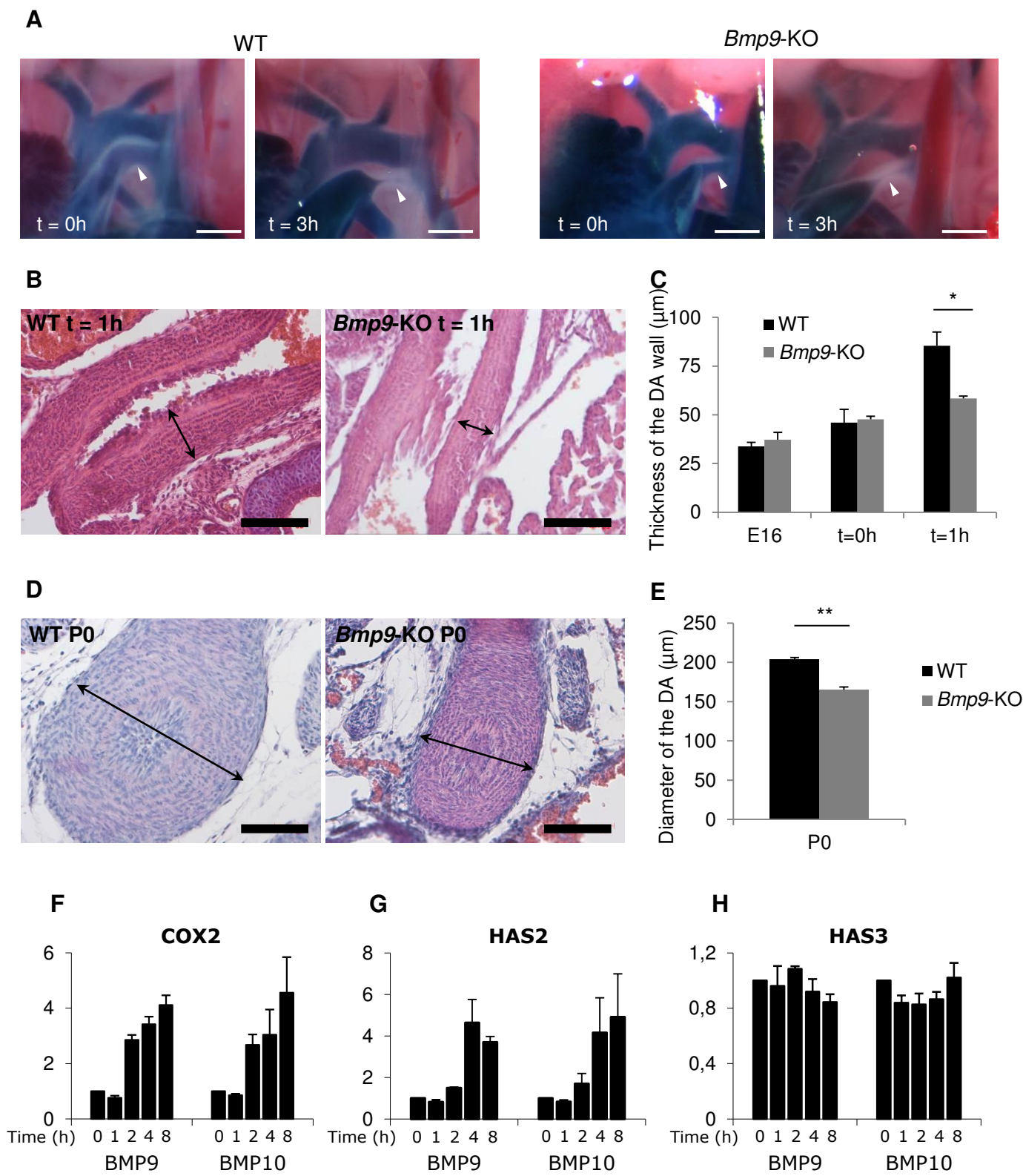


Figure 3 S.Levet



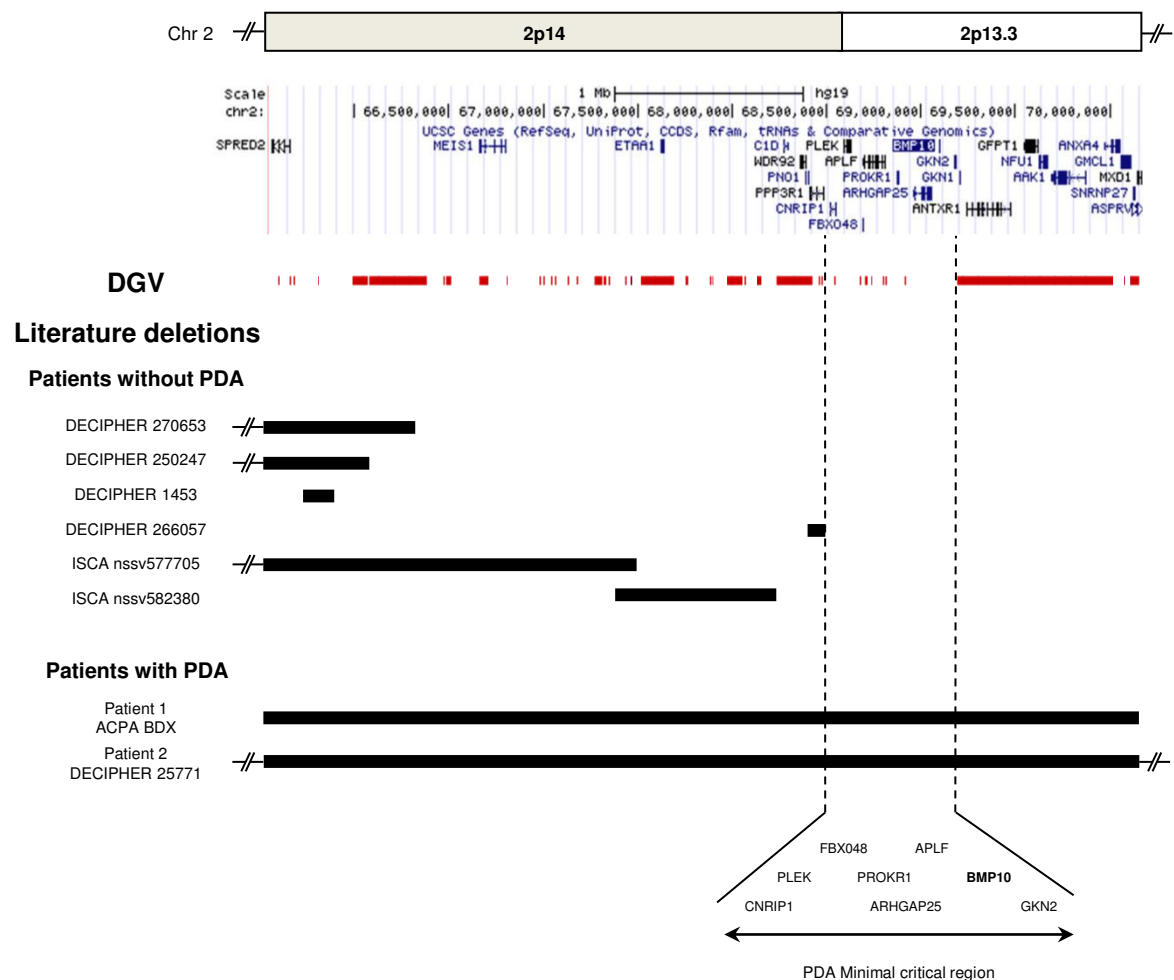
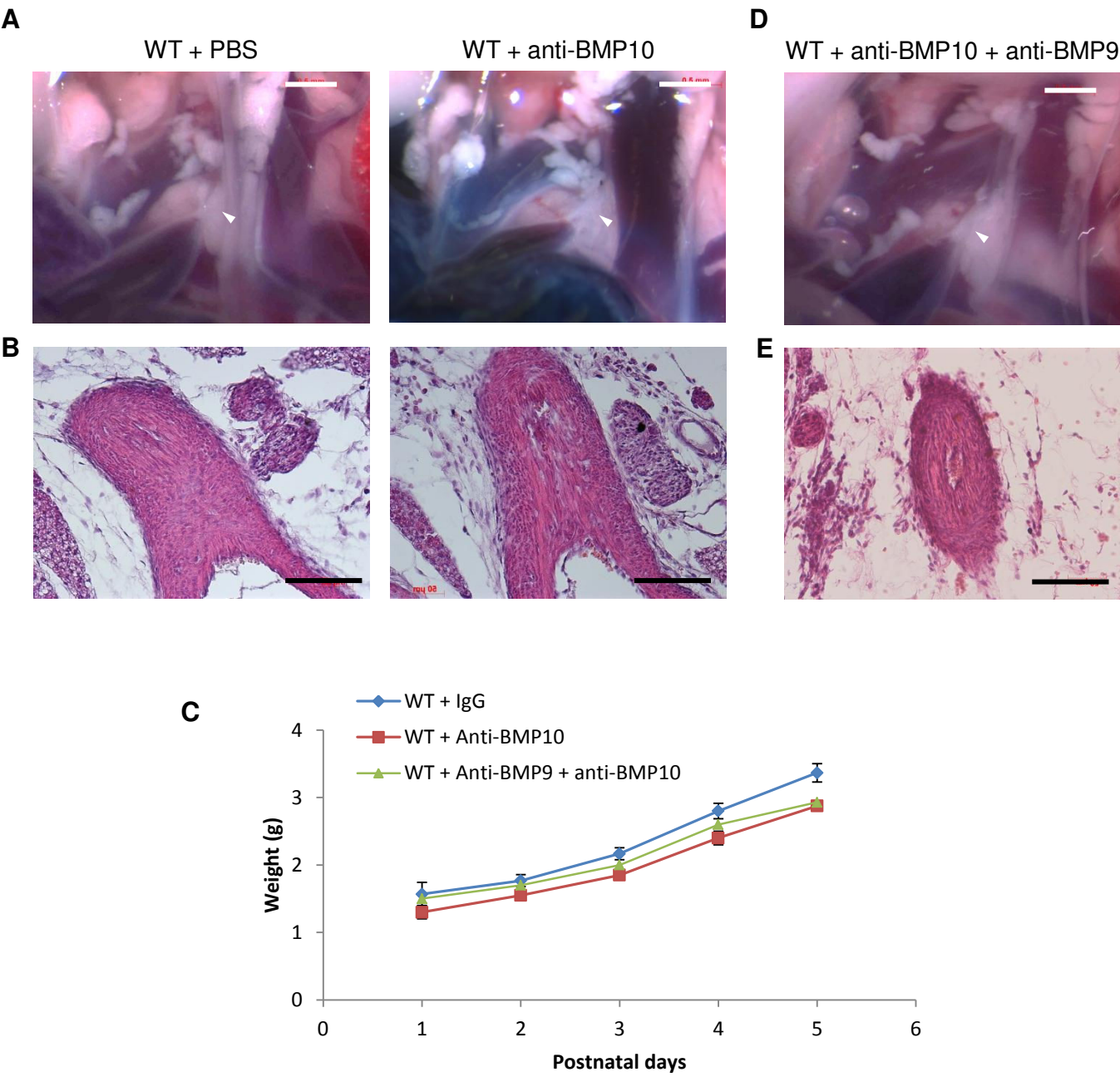
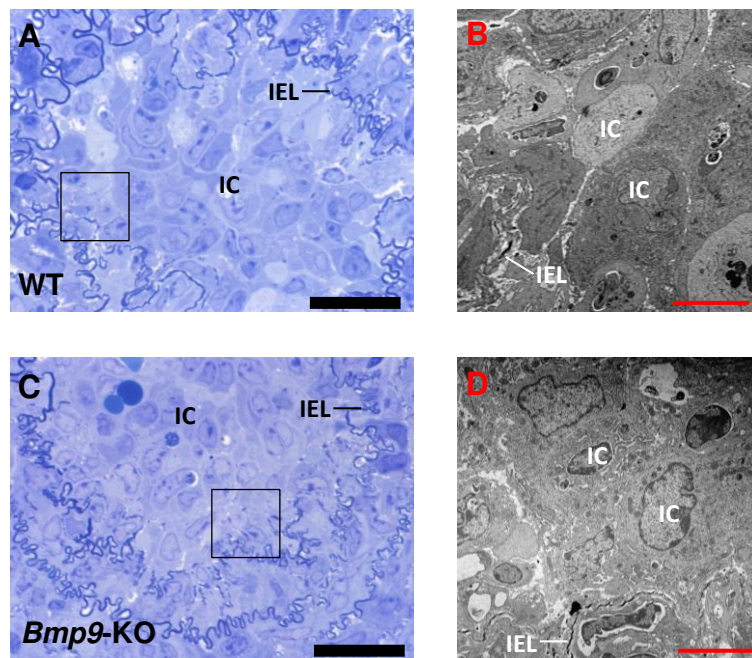


Figure 4 S.Levelt



Supplementary Figure 1 S.Level



Supplementary Figure 2 S. Levet

### 3. Bref résumé de l'article

- (1) Malgré des défauts d'épaississement et de remodelage de leur DA à P0 et P4, les souris *Bmp9*-KO compensent ces anomalies et sont viables.
- (2) Cependant, le traitement anti-BMP10 amplifie les défauts du DA des souris *Bmp9*-KO et entraîne une réouverture tardive de leur DA.
- (3) En accord avec ces résultats, nous démontrons que COX2 et HAS2, 2 protéines impliquées dans l'épaississement et la fermeture du DA, sont des cibles moléculaires de BMP9 et de BMP10.
- (4) Le rôle de ces BMP dans la fermeture du DA est renforcé par des données de génétique humaine qui identifient une région minimale critique de 700-kb, codant pour 8 gènes, dont *BMP10*, corrélée avec la présence d'un PDA.

### 4. Discussion et perspectives

Jusqu'à présent, nous n'avons pas réussi à expliquer en détail le mécanisme de réouverture du DA. C'est incontestablement une question importante à laquelle nous essayons de répondre. Il semble que le mécanisme de réouverture puisse être divisé en deux composantes : le remodelage du centre du DA, et les SMC de la media.

En ce qui concerne le remodelage du centre du DA, nous étudions l'hypothèse d'un défaut de transition endothélio-mésenchymateuse (endMT). Elle est étayée par le maintien anormal d'un phénotype endothélial chez les souris *Bmp9*-KO et par l'absence de dépôt de MEC entre les cellules de l'intima. Par une approche d'immunohistochimie nous testons l'apparition de marqueurs mésenchymateux (vimentine, SMA), la disparition de marqueurs endothéliaux (CD31, VE-cadhérine, facteur de von Willebrand) et le dépôt de protéines de la MEC dans le centre du DA (fibrilline, élastine). Par une approche *in vitro* nous évaluons la régulation par BMP9 et BMP10 l'expression de marqueurs de l'endMT ou de l'EMT, dont SNAIL. Nous travaillons pour cela avec des CE d'artère pulmonaire (hPAEC) mais dans l'idéal, il faudrait isoler les CE du DA.

Le phénotype des SMC de la média constitue l'autre paramètre de la réouverture que nous étudions. Dans ce processus, il faut imaginer que la vasoconstriction doit être maintenue suffisamment longtemps pour que le remodelage du centre puisse s'effectuer. Par ailleurs, les SMC doivent aussi progressivement perdre leur fonction contractile et/ou acquérir un phénotype synthétique et/ou subir de l'apoptose (Tananari et al., 2000) (Tada and Kishimoto, 1990). Le phénotype des SMC du DA doit donc être finement régulé. Dans ce contexte, la délétion sélective de *Jag1* dans les SMC conduit à un PDA causé par un défaut de différenciation des SMC (Feng et al., 2010). Le modèle présenté par les auteurs est celui d'un défaut de propagation de la signalisation JAG1-NOTCH dans la profondeur de la paroi du DA. *Jag1* a récemment été décrit comme une cible de BMP9 et de BMP10, de même que d'autres membres de la voie de signalisation NOTCH. (Cf partie précédente sur l'angiogenèse de la rétine et (Larrivee et al., 2012) (Moya et al., 2012)). Nous pouvons donc imaginer que l'absence de BMP9 et de BMP10 puisse affecter la différenciation des SMC. Dans ce cas-là, le phénotype observé résulterait en partie d'un défaut de maintien du phénotype contractile des SMC dans les jours qui suivent la naissance.

Echtler et al. ont récemment décrit que les plaquettes étaient impliquées dans la fermeture du DA. A l'appui de cette démonstration, ils présentent des modèles murins convaincants de PDA : les souris *Itga2b*-KO et les souris *Nfe2*-KO qui présentent toutes deux des défauts d'agrégation plaquettaire (Echtler et al., 2010). Des images de TEM (microscopie électronique à transmission) démontrent également le recrutement de plaquettes au niveau de l'endothélium du DA. C'est une caractéristique que nous n'avons pas retrouvée dans nos analyses de DA à P0 par TEM. Par ailleurs, l'analyse rétrospective d'une cohorte de nouveau-nés affectés de thrombocytopénie (faible nombre de plaquettes) avait montré un risque accru dans cette population de développer un PDA. Ces résultats ont depuis été contredits par plusieurs groupes (Sallmon et al., 2012) (Fujioka et al., 2011) (Shah et al., 2011).

Nos résultats chez la souris sont appuyés par des analyses génétiques humaines qui suggèrent que BMP10 serait plus important que BMP9 dans la fermeture du DA. La région minimale critique de 700-kb identifiée contient 7 gènes en plus de *BMP10*: *APLF*, *PLEK*, *FBX048*, *GKN2*, *PROKR1*, *CNRIP1*, *ARHGAP25*. Aucun d'entre eux n'est associé à la présence d'un PDA dans la littérature. Afin d'analyser plus en détail les rôles de BMP9 et de BMP10 chez l'homme, des dosages plasmatiques de ces deux protéines sont nécessaires. Pour cela, une collaboration a été mise en place avec l'équipe du Pr. Debillon, du Service de médecine et Réanimation Néonatale du CHU Grenoble. Du sang de cordon est prélevé chez des nouveau-nés prématurés et à terme pour effectuer les dosages de BMP9 et de BMP10. La cohorte est en cours de constitution.



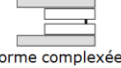
Notre étude est la première à démontrer un rôle de BMP9 et de BMP10 dans la fermeture du DA. Elle ouvre des perspectives en clinique humaine, mais elle apporte également un éclairage nouveau sur une phase méconnue de la physiologie du DA : sa transformation en ligament. Notre modèle de réouverture tardive du DA participera à une meilleure compréhension de ces étapes tardives de remodelage qui sont peu décrites dans la littérature.

## IV. BMP9 et BMP10 au cours de la gestation

### 1. Contexte de l'étude :

Une angiogenèse physiologique a lieu au cours des processus d'implantation et de placentation. C'est ce qui a conduit notre équipe à émettre l'hypothèse que BMP9 pouvait être impliqué dans la gestation et que les taux de BMP9 pouvaient varier au cours de cette période. Dans ce contexte, Marie Bidart, la doctorante qui m'a précédée, a démontré l'existence d'un pic de BMP9 au cours des 2 jours précédant la mise bas, sans pour autant avoir eu le temps de trouver sa provenance et son rôle (Données non publiées). J'ai poursuivi ce travail en y incluant l'étude de BMP10.

Pour étudier les taux de BMP9 et BMP10 nous utilisons 3 méthodes de dosage : un Elisa BMP9, un Elisa BMP10 et un dosage biologique. Chacune permet de doser des formes particulières des 2 protéines (Figure 52). Elles sont détaillées dans les paragraphes qui suivent.

Formes circulantes <b>BMP9</b>	Dosage Biologique	Dosage Elisa BMP9
 Pro-BMP9 non-processé	Non détecté	Détecté
 Mature BMP9	Détecté	Détecté
 Forme complexée	Détecté	Détecté



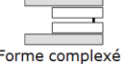
Formes circulantes <b>BMP10</b>	Dosage Biologique	Dosage Elisa BMP10
 Pro-BMP10 non-processé	Non détecté	?
 Mature BMP10	Détecté	Détecté
 Forme complexée	Non Détecté	Détecté

Figure 52 Formes plasmatiques de BMP9 et de BMP10 détectées par dosage biologique et par Elisa.

Un **Elisa BMP9** a été développé dans le laboratoire à partir de deux anticorps, un monoclonal (MAB3209, R&D Systems) et un polyclonal (BAF3209, R&D Systems). Ils sont dirigés contre la partie mature de BMP9 qu'elle soit sous une forme active, c'est à dire capable de se lier à son récepteur ALK1, ou non. Cet ELISA permet de détecter le BMP9 mature seul, le BMP9 processé mais associé de manière non-covalente à son prodomaine et le BMP9 non processé. Chez l'homme, nous avons montré que BMP9 circule sous une forme active avec le dimère mature complexé à son prodomaine et sous une forme inactive correspondant au dimère de pro-BMP9 non processé (Bidart et al., 2012).

L'**Elisa BMP10** que nous utilisons est commercial (USCNK, n° E92106Mu) et il permet de détecter les formes matures et complexées de BMP10 murin. Nous ne savons pas ce qu'il en est pour la forme non processée (ni même si elle est circulante).

Un **dosage biologique** a également été mis au point dans le laboratoire. Cette méthode consiste à cotransfecter dans des fibroblastes 3T3 un plasmide exprimant ALK1 et un plasmide exprimant la Firefly sous le contrôle du promoteur BRE (BMP Responsive Element) (Korchynskyi and ten Dijke, 2002). Cette méthode de dosage permet de détecter les formes actives de BMP9 et de BMP10. Il faut ici préciser que notre test biologique sur les fibroblastes est fait en diluant le plasma à 0,5% de manière à évaluer uniquement l'activation du récepteur ALK1. A des dilutions moins importantes, d'autres récepteurs seraient activés (ALK2, ALK3 et ALK6).



En résumé et à notre connaissance, chez l'homme, BMP9 circule sous 2 formes : la forme dimérique non-processée (inactive) et la forme processée mature associée à son prodomaine (active) (Bidart et al., 2012). Chez l'homme, BMP10 circule au moins en partie sous une forme processée (Sengle et al., 2008; Souza et al., 2008). Chez la souris, BMP10 circule sous une forme inactive et BMP9 circule sous une forme active mais nous ne savons pas à quoi elles correspondent.

## 2. Résultats :

### a. Pics de BMP9 et de BMP10 au cours des 2 jours précédant la mise bas.

L'étude des variations des taux de BMP10 a été faite à partir d'un groupe de 7 souris C57Bl6, dont le sang était prélevé régulièrement par prélèvement rétro-orbitaire au cours de la gestation. Le dosage a été fait avec le kit ELISA commercial, le plasma étant dilué au 1/20 dans du PBS triton 0,5% pour s'affranchir de l'effet matrice. Les résultats montrent un pic de BMP10 plasmatique dans les 2 jours précédant la mise-bas (Figure 53, A).

Nous avons voulu savoir si ce pic de BMP10 était actif dans le plasma par un dosage biologique. Pour cela, nous avons utilisé du sang de souris *Bmp9-KO* dont on sait qu'une activité mesurée dans le plasma ne peut pas être attribuée à BMP9. Chez les souris *Bmp9-KO*, nous ne détectons aucun pic d'activité, alors que comme précédemment, nous détectons un pic de BMP10 (Figure 53, B). En fin de gestation, les souris présentent donc un pic de BMP10, et, comme chez les souris non gestantes, ce BMP10 n'est pas actif dans notre test biologique. Des mécanismes d'activation locaux doivent donc exister in vivo, ou alors ce sont d'autres récepteurs qui sont activés.

Finalement, en rassemblant les résultats des dosages de BMP9 (dosage biologique) et de BMP10 (dosage Elisa), on observe que les 2 protéines présentent un pic au cours des 2 jours précédant la mise-bas (Figure 53, C). Il est intéressant de noter que le niveau de BMP10 circulant est nettement supérieur au niveau de BMP9 circulant.

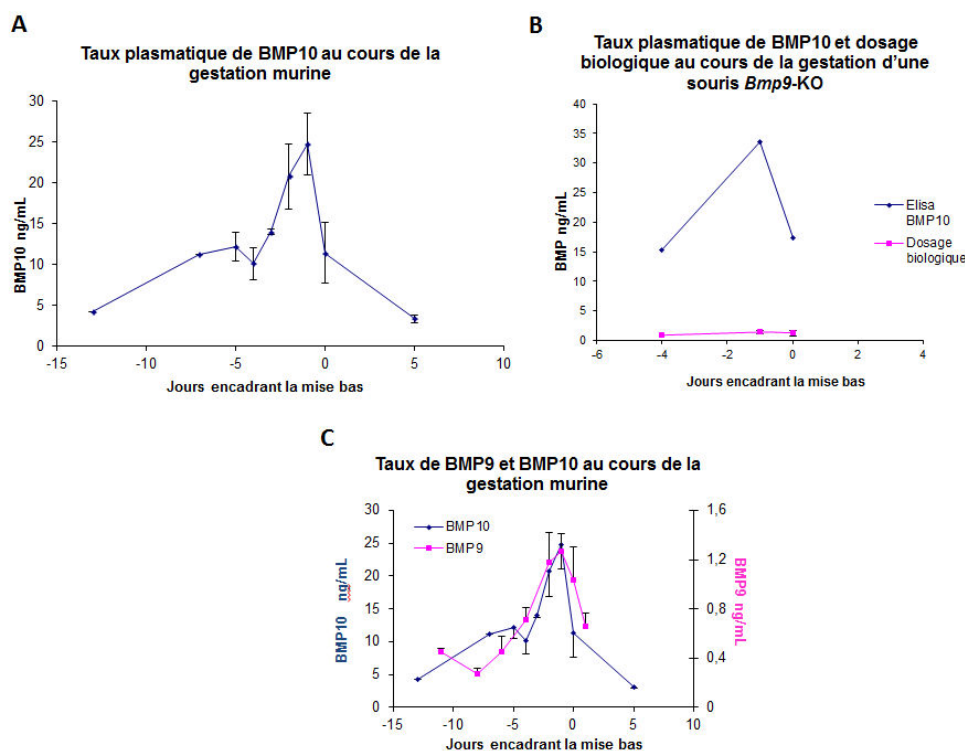


Figure 53 Taux de BMP9 et de BMP10 au cours de la gestation murine.

Nous avons ensuite recherché l'origine tissulaire du pic de BMP10 plasmatique. Pour cela, 9 souris OF1 gestantes ont été sacrifiées à 3 temps différents (E11.5, E14.5 et E17.5). Les expressions de *Bmp9* et de *Bmp10* ont été analysées par RT-qPCR après extraction des ARN des tissus provenant des embryons, des foies des femelles gestantes et des placentas. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de référence *Hprt*. Les résultats montrent une induction importante de BMP10 dans le placenta en fin de gestation. Entre E11.5 et E17.5, l'expression de *Bmp10* est multipliée plus de 13 fois (Figure 54, A). Cette expression est stable dans le foie des femelles gestantes et dans les embryons (Résultats non montrés). L'expression de *Bmp9* dans le placenta n'augmente pas au cours de la gestation, voire même décroît légèrement (Figure 54, B), tandis qu'elle reste stable dans le foie et dans les embryons (Résultats non montrés). De la même manière que pour les protéines, les niveaux d'expression ARN de *Bmp10* semblent beaucoup plus importants que ceux de *Bmp9*, de l'ordre de 1000 fois plus.

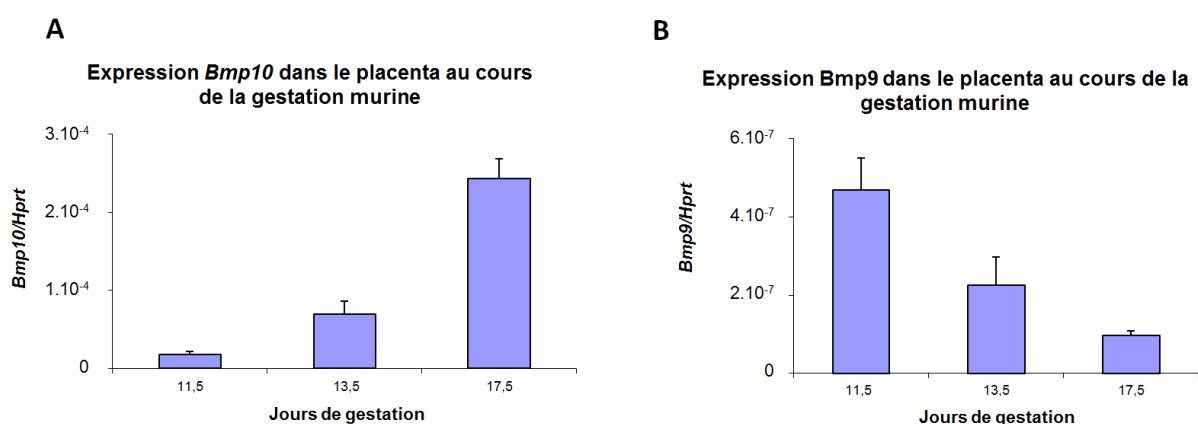


Figure 54 Expression ARN de BMP10 et de BMP9 dans le placenta au cours de la gestation murine

Bien que l'expression de *Bmp9* n'augmente pas en fin de gestation dans le placenta, il n'en reste pas moins qu'un pic plasmatique de la protéine s'observe au même moment chez la femelle gestante. Devant ces données contradictoires, nous avons voulu déterminer si le BMP9 circulant était d'origine fœtale ou maternelle. Pour cela, nous avons croisé une femelle *Bmp9*-KO avec un mâle WT, et des prélèvements rétro-orbitaires ont été réalisés au cours de la gestation.

Il faut à nouveau préciser que le croisement d'un mâle et d'une femelle *Bmp9*-KO engendre une portée viable, les femelles mettant-bas sans difficulté malgré l'absence d'un pic d'activité biologique dans leur plasma. De plus, la durée de gestation n'apparaît pas différente de celle des WT. Une autre précision concerne le taux de BMP9 des hétérozygotes : il est identique à celui de WT.

Dans hypothèse d'une origine fœtale du pic de BMP9 plasmatique, en croisant une femelle *Bmp9*-KO avec un mâle WT, nous devrions observer un pic de BMP9 biologiquement actif dans le plasma de la mère. Or, le suivi par dosage biologique de ce croisement ne révèle absolument aucun pic d'activité biologique. Cela semble indiquer que le pic de BMP9 observé chez la mère est d'origine maternelle. Sachant qu'il n'y a pas d'induction de *Bmp9* dans le foie des femelles gestantes, et en écartant l'hypothèse d'une régulation post-traductionnelle de BMP9, une autre source de BMP9 doit donc exister chez la femelle gestante. Dans le contexte de la gestation et de la préparation à la mise-bas, le myomètre pourrait être la source en question.

L'ensemble de ces résultats met en lumière un nouveau site de production de BMP10 et de BMP9 : le placenta. Toutefois, bien que les pics plasmatiques de ces 2 protéines soient superposables, leurs activités biologiques sont différentes : BMP9 est biologiquement actif, ce qui n'est pas le cas de BMP10. Les expressions ARN dans le placenta de *Bmp9* et de *Bmp10* semblent également évoluer dans un sens opposé en fin de gestation. Les rôles de BMP9 et de BMP10 pourraient donc être différents au cours de la gestation.

#### b. Rôles de BMP9 et de BMP10 au cours de la gestation.

Comme mentionné précédemment, le croisement d'un mâle et d'une femelle *Bmp9*-KO engendre une portée viable, les femelles mettant-bas sans difficulté et sans retard notable. La taille des portées *Bmp9*-KO est aussi identique à celle des WT. En conséquence, soit BMP9 joue un rôle négligeable au cours de la gestation, soit son absence est compensée par BMP10.

Nous avons donc voulu étudier l'implication de BMP10 dans la gestation. L'invalidation de BMP10 étant létale au cours du développement embryonnaire, notre stratégie a consisté à injecter un anticorps neutralisant BMP10 à des souris WT gestantes. Nous avons décidé d'effectuer l'injection de l'anti-BMP10 (R&D Systems MAB 2926 à 5 mg/kg en intra-péritonéale) au 16<sup>ème</sup> jour de gestation, c'est-à-dire au début du pic de BMP10. Dans ces conditions, les souriceaux issus d'une césarienne sont viables. Nous n'avons cependant pas laissé la mise-bas se faire par voie basse, ce qu'il serait intéressant de faire.

Pour tester une possible redondance entre BMP9 et BMP10 dans la gestation, nous avons injecté l'anti-BMP10 à une femelle gestante *Bmp9*-KO. Dans ces conditions, la femelle arrive à mettre bas mais les nouveau-nés meurent dans l'heure qui suit leur naissance. Dans le cas d'une césarienne précédant de quelques heures la mise bas naturelle, les souriceaux meurent dans les 2 heures suivant leur naissance. Ils présentent un phénotype hémorragique au niveau du crâne (Figure 55). Ces résultats préliminaires suggèrent que BMP9 et BMP10 sont redondants en fin de gestation et qu'ils seraient nécessaires à la survie du nouveau-né plutôt qu'au déclenchement de l'accouchement.

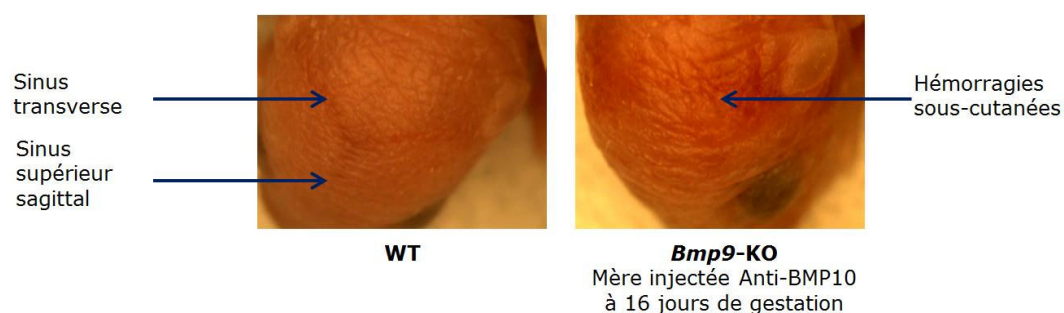


Figure 55 Crâne de nouveau-nés, une heure après leur naissance, après une mise-bas naturelle.

### 3. Discussion et perspectives

Les résultats présentés montrent un pic de BMP9 et de BMP10 entre 1 et 2 jours avant la mise-bas chez la femelle. Ils sont à mettre en parallèle avec ceux observés durant la période périnatale chez le souriceau. La question se pose de savoir si les taux mesurés chez la femelle gestante ont un rôle précis chez elle ou s'ils servent uniquement aux remodelages vasculaires chez l'embryon, comme cela a été mis en évidence dans les résultats présentés dans les chapitres précédents. Nous n'avons pour l'instant pas résolu cette question.

Des résultats très récents montrant l'implication de BMPR2 dans le maintien de la gestation apportent un axe de travail sur le rôle de BMP9 et de BMP10 dans la gestation (Nagashima et al., 2013). BMP9 et BMP10 pourraient être les ligands de BMPR2 impliqués dans ce processus. Les souris dont BMPR2 a été invalidé dans l'utérus (à l'aide de la Cre-recombinase exprimée sous le contrôle du promoteur du récepteur de la progestérone) sont stériles, principalement du fait d'un défaut de décidualisation, associé à des anomalies de vascularisation du placenta. Le processus de décidualisation consiste en la prolifération et la différenciation des cellules de l'endomètre maternel en cellules sécrétrices riches en glycogène et en lipides. Les femelles gestantes présentent également des défauts dans la différenciation et la prolifération des trophoblastes, en lien avec une diminution de l'expression de la Corine. Il serait intéressant d'étudier l'expression de cette protéine, qui est associée à l'invasion des trophoblastes, et qui pourrait être une cible de BMP9 dans les trophoblastes ou les CE. Par ailleurs la létalité intervenant en milieu de gestation chez les souris *Bmpr2*-KO, il faudrait évaluer les effets de la neutralisation de BMP9 et de BMP10 dès la mi-gestation et non à E16, en fin de gestation. Cela permettrait de révéler des fonctions potentielles de BMP9 et de BMP10 dans le processus de décidualisation.

Ce travail sur l'implication de BMP9 et BMP10 dans la gestation murine ouvre des perspectives chez l'homme. A la suite de ses premiers dosages de BMP9 chez la souris, Marie Bidart avait montré une augmentation des taux de BMP9 plasmatique en fin de grossesse dans une cohorte de femmes enceintes provenant du CHU Grenoble. Nous n'avons pas encore effectué des dosages de BMP10 plasmatique, mais il serait intéressant de le faire. La perspective serait de disposer de marqueurs de l'accouchement, dont l'intérêt dans l'évaluation de la menace d'accouchement prématuré (MAP) serait indéniable. La MAP se définit comme l'association de contractions utérines et de modifications du col utérin avant 37 semaines d'aménorrhée (Goffinet and Kayem, 2002) et constitue la première cause d'hospitalisation pendant la grossesse. Cependant, entre la menace et le réel accouchement prématuré, le clinicien ne possède pas à ce jour de marqueur fiable lui permettant de discriminer ces 2 groupes (Gallot, 2007). Cette absence de marqueur est d'autant plus problématique que la mise en œuvre d'une corticothérapie de maturation pulmonaire peut se révéler nécessaire pour améliorer la survie des prématurés.

Des résultats préliminaires chez l'homme obtenus au cours de ma thèse montrent que les trophoblastes constituent un nouveau type cellulaire exprimant *Bmp9*. Cette stabilité d'expression pourrait permettre d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression de *Bmp9* qui sont à ce jour inconnus. En effet les hépatocytes isolés et mis en culture perdent très rapidement l'expression de *Bmp9*, empêchant de fait toute étude de sa régulation.

Au final, ces résultats sur l'implication de BMP9 et de BMP10 dans la gestation à la fois humaine et murine offrent des perspectives à la fois au niveau de la recherche fondamentale et au niveau de la recherche clinique.

## V. La forme soluble du récepteur ALK1

### 1. Contexte de l'étude

La signalisation sur un récepteur transmembranaire dépend, entre autre, (1) de la présence de son ligand actif dans le milieu et (2) de la quantité de récepteur présent à la surface de la membrane. Ces deux paramètres peuvent varier si le récepteur est libéré dans le milieu extracellulaire, par clivage protéolytique ou épissage alternatif.

Des récepteurs de la famille TGF $\beta$  ont déjà été décrits sous une forme soluble circulant dans le milieu. ALK5, l'endogline et le betaglycan peuvent être relargués par clivage protéolytique (Liu et al., 2009) (Venkatesha et al., 2006) (Velasco-Loyden et al., 2004). ALK5 et ALK7 peuvent aussi subir un épissage alternatif conduisant à la production d'une forme soluble (Choi, 1999) (Roberts et al., 2003). Par ailleurs, ces formes solubles peuvent avoir un réel intérêt clinique. C'est le cas de la forme soluble de l'endogline qui est un marqueur de la pré-éclampsie, un syndrome d'hypertension artérielle spécifique de la gestation.

Dans ce contexte, mon travail a consisté d'une part à étudier s'il existe une forme soluble de ALK1, et d'autre part à comprendre le mécanisme qui permet sa libération.

Dans sa forme transmembranaire, ALK1 humain est une protéine de 503 acides aminés dont le poids moléculaire est de 55 kDa. Son domaine extracellulaire contient 118 acides aminés, ce qui représente environ 13 kDa, mais il est potentiellement glycosylé et pourrait donc avoir un poids moléculaire de 20 kDa (Figure 56) (Lamouille et al., 2002) (Wu, 1995 #53).

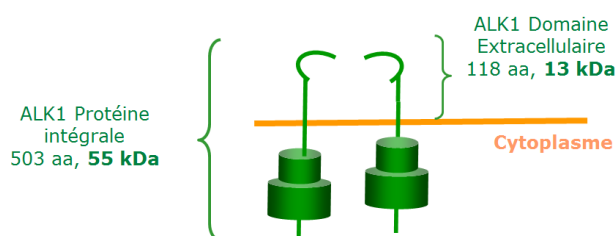


Figure 56 Schéma du récepteur ALK1

### 2. Résultats

#### a. Présence de ALK1 soluble dans le plasma humain.

Le préalable à l'étude de sALK1 consistait à mettre au point un Elisa ALK1 humain. Nous avons développé cet Elisa au sein du laboratoire. Les anticorps de capture et de détection proviennent de chez R&D Systems (AF370, 1 $\mu$ g/mL et BAF370, 100ng/mL) et la gamme de détection (ALK1-Fc : partie extracellulaire d'ALK1 fusionnée au domaine Fc des immunoglobulines) va de 31 pg/mL à 1 ng/mL (Figure 57). Le test de dilution sériée du plasma est linéaire, il n'y a donc pas d'effet matrice qui interfère dans ce dosage. Cependant, nous avons décidé de diluer les plasmas au demi dans du PBS BSA 1% afin de diminuer la quantité de plasma nécessaire pour le dosage. Aucune réactivité croisée n'est observée avec d'autres récepteurs ALK testés à 50ng/mL (ALK2, 3 et 6, les plus proches d'ALK1), l'Elisa développé est donc spécifique.

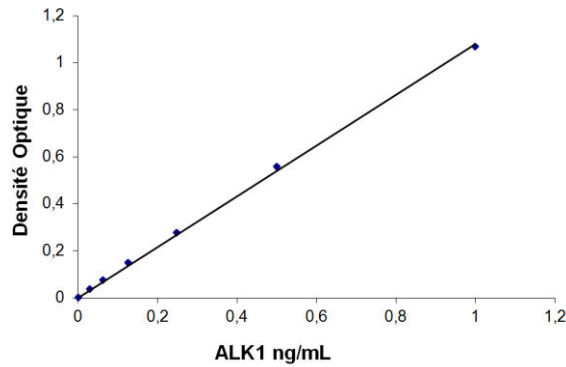


Figure 57 Droite d'étalonnage de l'Elisa ALK1

Nous avons dosé sALK1 dans le plasma d'une cohorte de 23 donneurs sains provenant de l'EFS (Etablissement Français du Sang). Pour la première fois, nous montrons la présence de sALK1 dans le plasma d'une population saine (Figure 58, A). La moyenne des taux mesurés est de 280 pg/mL, mais on note une forte hétérogénéité entre les personnes. Alors que la majorité possède des taux d'ALK1 compris entre 50 et 200 pg/mL, environ 20% de la population présente des taux supérieurs à 500 pg/mL. A la suite de ce premier résultat encourageant, nous avons dosé ALK1 dans le milieu conditionné de différents types de cellules endothéliales primaires : HUAEC (Human Umbilical Arterial Endothelial Cells), HUVEC (Human Umbilical Venous Endothelial Cells) et HMVECd (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells). Dans ce cas également, une forme soluble de ALK1 est mesurée après 48h de culture sans sérum, avec des taux de 50 à 250 pg/mL en fonction du type cellulaire (Figure 58, B).

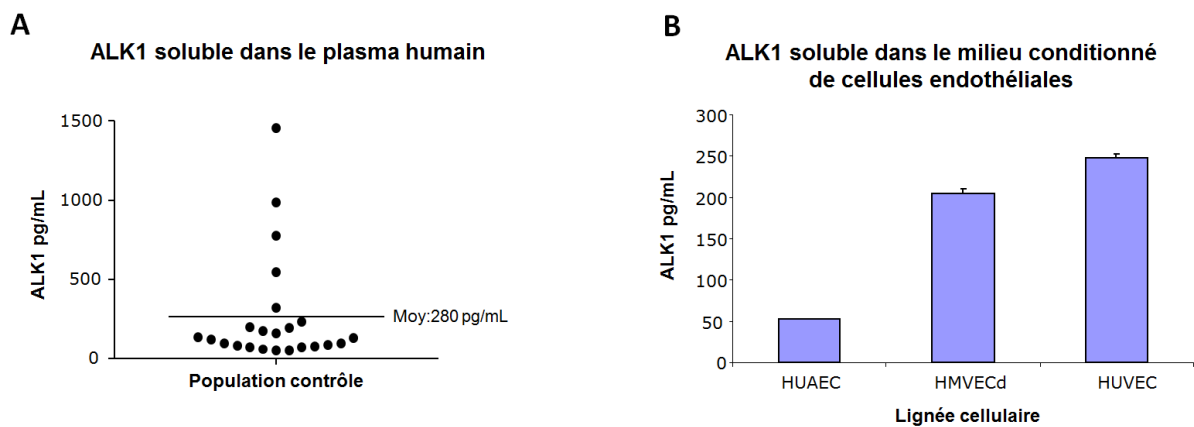


Figure 58 Dosage de ALK1 soluble dans le plasma humain et dans du milieu conditionné de CE.

Conditions de culture : 48h de culture sans sérum, cellules confluentes, 10mL de milieu de culture, boîte de 75 cm<sup>2</sup>

Ces deux résultats de dosage de ALK1 montrent que ce récepteur est présent sous une forme soluble dans le plasma humain et dans le milieu conditionné de cellules endothéliales. L'étape suivante consiste naturellement à caractériser cette forme soluble.

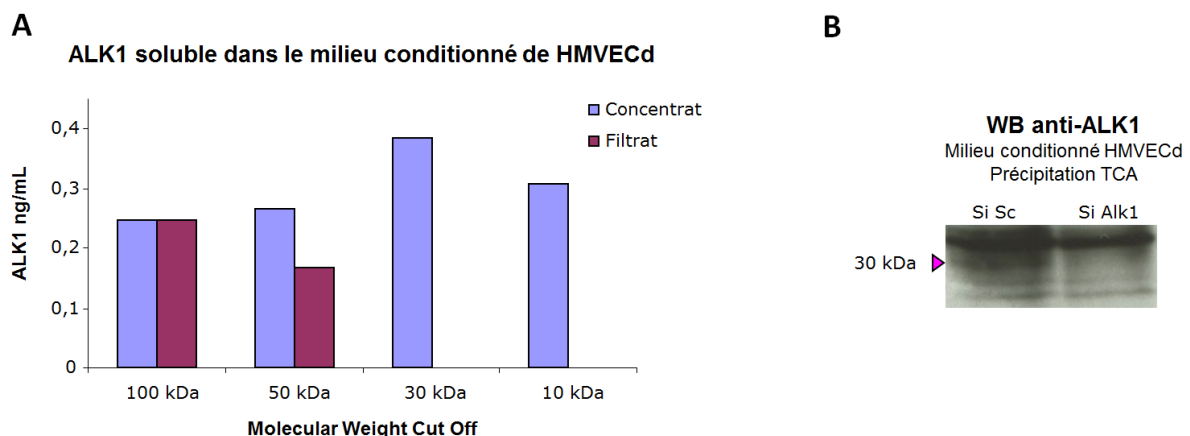
#### b. Caractérisation de la forme soluble de ALK1

La première étape consiste à déterminer la taille du fragment soluble de ALK1. Dans un premier temps, du milieu conditionné de HMVECd a été filtré sur des membranes de différents MWCO (Molecular Weight Cutt Off) : 100, 50, 30 et 10 kDa. Le concentrat, c'est-à-dire la fraction retenue au-dessus du filtre, et le filtrat, c'est-à-dire la fraction qui est passée au travers du filtre, ont



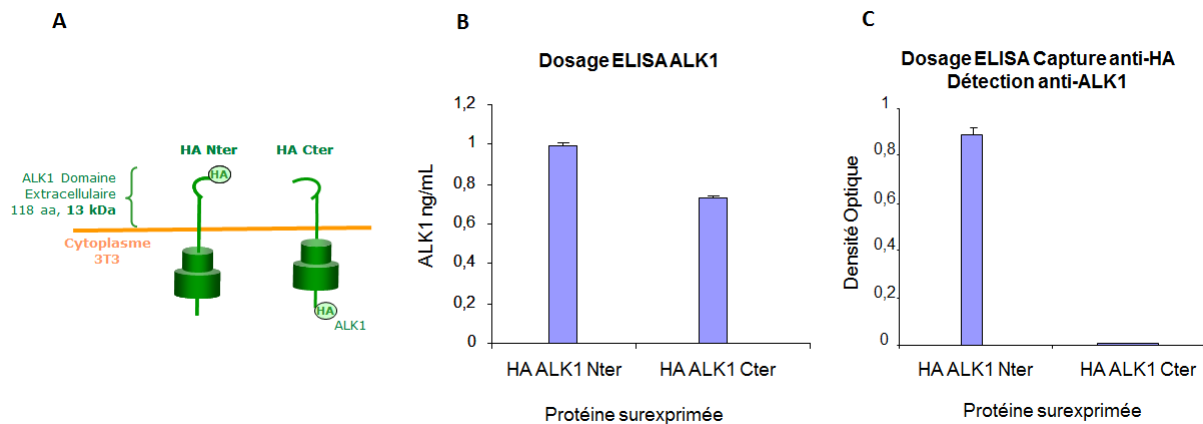
été dosés en Elisa ALK1. Les résultats montrent que sALK1 est présent dans les filtrats des membranes de MWCO de 100 et 50 kDa. Cela signifie que la taille de sALK1 est plus petite que 50kDa. Par contre, sALK1 n'est plus présent dans les filtrats 30 et 10kDa, sALK1 possède donc une taille supérieure à 30 kDa (Figure 59, A). Grâce à cette méthode assez simple mais imprécise, il apparaît que la taille de sALK1 est globalement comprise entre 30 et 50 kDa. Ces résultats permettent également d'exclure le fait que ALK1 circule dans le plasma sous forme d'exosomes. Ces vésicules membranaires circulantes ont en effet une taille qui varie approximativement entre 0,1 et 2µm, et qu'un MWCO de 200kDa équivaut à un diamètre de pore d'environ 0,01µm.

Dans un second temps, nous avons essayé de déterminer précisément la taille de sALK1 par Western Blot. Des stratégies variées ont été employées pour essayer de s'affranchir des nombreuses bandes aspécifiques que génèrent nos anticorps anti-ALK1. L'option des ARN interférents, siRNA, pour inhiber la production de ALK1 par des HMVECd, suivie d'une précipitation à l'acide trichloro acétique (TCA) est la plus claire. Les HMVECd ont été transfectées avec un ARN interférent contrôle, Si Sc (Si Scramble) ou avec un si ALK1. Après 48h de culture sans sérum, le milieu conditionné est précipité au TCA puis un WB est effectué. La seule bande supplémentaire observée dans la condition contrôle migre à 30 kDa (Figure 59, B). Cette taille se situe dans l'intervalle trouvé précédemment, mais ne concorde pas avec celle attendue (13-20kDa).



**Figure 59 Détermination du poids moléculaire de la forme soluble de ALK1**

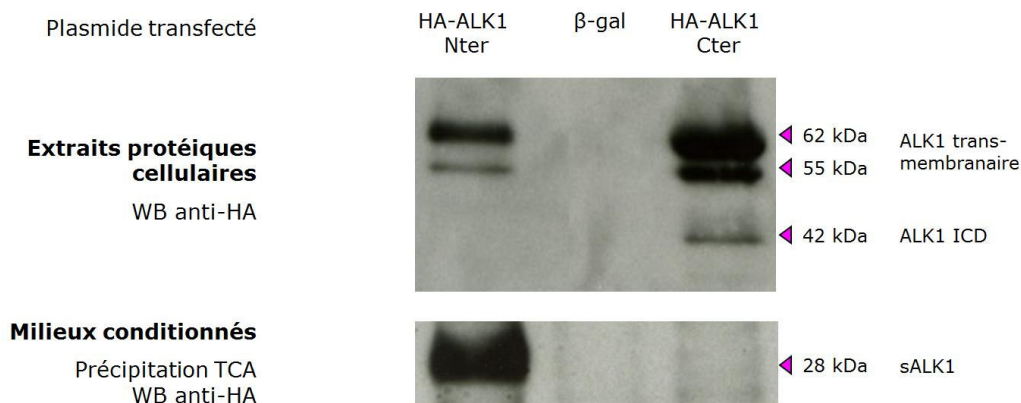
Dans un 3<sup>ème</sup> temps, nous avons voulu confirmer ces résultats dans un autre modèle cellulaire. Notre stratégie a consisté à transfecter des fibroblastes 3T3 avec un plasmide permettant d'exprimer ALK1 avec un tag HA placé soit à l'extrémité C-terminale, soit à l'extrémité N-terminale (Figure 60, A). Les milieux conditionnés issus de ces 2 conditions ont ensuite été dosés avec l'Elisa ALK1 et avec un nouvel Elisa qui a été développé pour l'occasion. Il utilise un anticorps de capture dirigé contre le tag HA (Roche, 3F10) et l'anticorps de détection dirigé contre ALK1 (R&D Systems, BAF370). Ce nouvel Elisa permet de détecter uniquement ALK1 tagué HA. Les résultats du dosage Elisa ALK1 montrent qu'une forme soluble de ALK1 est également produite par les fibroblastes 3T3 surexprimant ALK1 (Figure 60, B). La position du tag HA n'influence pas la concentration de sALK1 dans le milieu conditionné. Dans le cas de l'Elisa capture-HA/détection-ALK1, il n'y a pas de signal lorsque ALK1 est tagué HA dans la partie C terminale intracellulaire (Figure 60, C). La protéine soluble détectée est donc déletée d'une partie de son extrémité C terminale.



**Figure 60 Détection de ALK1 soluble dans un modèle de fibroblaste 3T3.**

(A) Schéma de la position du tag HA dans la protéine ALK1 surexprimée. (B) et (C) Dosage de milieux conditionnés de 3T3 transfectés HA-ALK1-Nter ou HA-ALK1-Cter.

Ces résultats se confirment par une approche WB. Dans les milieux conditionnés de 3T3 transfectés HA-ALK1-Nter, la bande correspondant à ALK1 soluble présente un poids moléculaire apparent de 28kDa (Figure 61). En miroir, dans les extraits protéiques cellulaires, seule la condition de transfection HA-ALK1-Cter présente un signal d'un poids moléculaire apparent de 42 kDa. Ce fragment correspond à la forme intracellulaire tronquée de ALK1, nommée ALK1 ICD pour « Intra Cellular Domain ». Et dans ces mêmes extraits protéiques cellulaires, dans les deux conditions HA-ALK1-Cter et HA-ALK1-Nter, le doublet caractéristique de la forme transmembranaire est retrouvé (Figure 61).



**Figure 61 Détection des formes soluble et intracellulaire de ALK1**

Dans le modèle 3T3, ALK1 apparaît être clivé en 2 fragments distincts : le fragment extracellulaire, de 28kDa est libéré dans le milieu extracellulaire, tandis que le fragment intracellulaire de 42 kDa reste dans le cytoplasme.

La seconde étape de caractérisation consiste à trouver par quel mécanisme ALK1 est libéré dans le milieu extracellulaire. La littérature montre que ALK5 (Lamouille 2009) et l'endogline (Venkatesha 2009) sont clivées par des protéases membranaires. Mais d'autres récepteurs de la famille TGF $\beta$  subissent aussi des épissages alternatifs conduisant à la formation d'une forme soluble. C'est le cas d'ALK5 (Choi 1999) et d'ALK7 (Roberts, 2003 #2314). Sachant que le plasmide codant

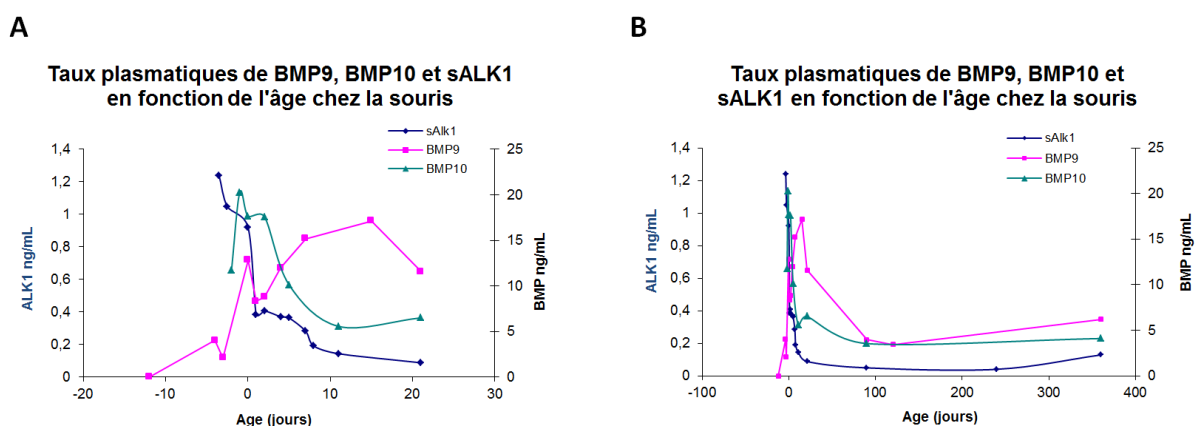
pour ALK1, qui correspond à l'ARN messager d'*ALK1*, permet d'obtenir une protéine clivable dans le modèle 3T3, notre hypothèse est que ALK1 subit un clivage protéolytique de son domaine transmembranaire. Pour essayer de mettre cela en évidence, nous avons donc incubé des HMVECd avec différents inhibiteurs de protéases (GM6001, Aprotinine, Leupeptine et Pepstatine) avant de doser sALK1 dans les milieux conditionnés. Pour aucun des inhibiteurs testés on ne retrouve une diminution de la concentration en sALK1 dans les milieux conditionnés. Cela peut signifier que la protéase impliquée n'est pas une protéase classique.

Les 2 modèles étudiés, cellules endothéliales et fibroblastes 3T3, sont capables de produire une forme soluble de ALK1. Son poids moléculaire serait d'environ 30kDa, soit une dizaine de plus qu'attendu. La forme soluble d'ALK1 clivée pourrait être une forme particulièrement glycosylée. Il est possible que le clivage de ALK1 se fasse dans des conditions pathologiques et/ou dans des modèles cellulaires particuliers dans lesquels il serait plus facile de le caractériser. La question de ce clivage reste ouverte.

### c. Dosage de ALK1 soluble chez la souris

Nous avons ensuite utilisé l'Elisa ALK1 pour doser cette forme soluble dans différentes situations physiologiques. Au cours de la gestation murine, dans le plasma de la mère, les taux de ALK1 restent globalement stables (Résultats sont montrés). Nous avons également dosé sALK1 dans le plasma de fœtus issus de césariennes ainsi que dans le plasma de nouveau-nés. Les plasmas collectés à différents temps avaient précédemment été dosés pour BMP9 (Dosage biologique) et BMP10 (Elisa) (Bidart 2012, Ricard 1012). La Figure 62 présente une compilation des 3 dosages.

Concernant ALK1, on remarque que les taux sont très élevés avant la naissance, de l'ordre de 1ng/mL (Figure 62, A). Ils chutent ensuite rapidement, jusqu'à circuler au cours de la vie adulte à des taux de l'ordre de 0.1ng/mL (Figure 62, B). On remarque également que les taux de BMP9 et de sALK1 sont en miroir au cours de la période périnatale. Cela suggère que sALK1 pourrait être impliqué dans la régulation de la biodisponibilité de BMP9. Une hypothèse serait que la forme soluble d'ALK1 pourrait inhiber la signalisation en séquestrant son ligand. Cette hypothèse pourrait être testée *in vitro*.



**Figure 62 Evolution des taux de sALK1, BMP9 et BMP10 en fonction de l'âge chez la souris.**  
(A) Echelle de temps d'un mois, (B) Echelle de temps d'un an.

### 3. Discussion Perspectives

L'ensemble de ces résultats démontre pour la première fois l'existence d'une forme soluble d'ALK1, produite par les cellules endothéliales et circulant à des taux élevés au cours de la période périnatale.

L'étude de sALK1 est importante dans le contexte actuel de développement de stratégies thérapeutiques ciblant ALK1 dans le cancer. La compréhension des effets des drogues nécessite de saisir l'ensemble des paramètres affectés, dont l'existence d'une forme soluble de ALK1 et de ses rôles. Deux stratégies sont développées : l'utilisation de la partie extracellulaire de ALK1 fusionnée au fragment Fc des immunoglobulines (ALK1-Fc) et les anticorps ciblant ALK1. ALK1-Fc est développé dans une version murine (RAP-041) et humaine (ACE-041 ou Dalantercept) par Acceleron Pharma. Chez la souris, une étude a montré que l'administration de ALK1-Fc retarde la croissance tumorale (Cunha et al., 2010). Chez l'homme, un essai clinique de phase 2 est en cours pour évaluer l'intérêt du Dalantercept dans des cancers de l'ovaire, des trompes de Fallope et dans les carcinomes primaires du péritoine. Un anticorps ciblant ALK1 est développé par Pfizer (PF03446962) et est actuellement en essai clinique de phase 2 dans le traitement des mésothéliomes.

De manière plus large, des stratégies thérapeutiques reposant sur l'utilisation de formes solubles de récepteurs sont actuellement développées. La méthode consiste à coupler le domaine extracellulaire du récepteur d'intérêt avec la région Fc des immunoglobulines. On peut notamment citer l'Aflibercept (VEGFR1-Fc et VEGFR2-Fc) co-développé par Sanofi-Aventis et Regeneron Pharmaceuticals et approuvé pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques.

Une protéine recombinante exprimant le domaine extracellulaire de l'endogline couplé au domaine Fc des immunoglobulines (Eng-Fc) a récemment été produite par Acceleron Pharma. L'Eng-Fc lie avec une forte affinité BMP9 et BMP10 mais aucun des autres membres de la famille TGF $\beta$ . Cela suggère que les effets de l'endogline soluble sont principalement causés par une inhibition de la signalisation BMP9/BMP10/ALK1 (Castonguay et al., 2011).

Acceleron Pharma a également développé la protéine de fusion ACTR2B-Fc (dénommée ACE-031). Son effet majeur est l'augmentation de masse musculaire, liée à la séquestration de la myostatine (GDF8) un membre de la famille TGF- $\beta$  proche de BMP11. Des essais cliniques sont menés chez des patients atteints de la myopathie de Duchenne et chez des femmes post-ménopausées.

La découverte de sALK1 ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de la signalisation ALK1, notamment l'étude de l'inhibition de BMP9 et de BMP10 par la forme soluble de ALK1. Le mécanisme de libération de la forme soluble extracellulaire reste pour l'instant en suspens. Par contre, nous n'avons pas exploré la piste du fragment intracellulaire de ALK1 que nous avons mis en évidence. Il est envisageable que ce fragment puisse être transloqué dans le noyau et agisse comme un facteur de transcription. C'est en effet ce qui est décrit pour ALK5, le récepteur du TGF $\beta$  (Mu et al., 2011). Il serait alors intéressant d'évaluer la localisation cellulaire de ce fragment, à l'aide d'anticorps dirigés contre la partie intracellulaire d'ALK1. Bien que cela ne soit pas décrit pour ALK5, il est possible que le complexe  $\gamma$ -sécrétase soit impliqué dans la libération du fragment intracellulaire d'ALK1. Cela peut être mis en évidence par le traitement avec du DAPT, un inhibiteur de ce complexe.

La découverte de l'existence d'une forme soluble de ALK1 ouvre des perspectives en clinique humaine, notamment pour un rôle de biomarqueur. La forme soluble de l'Endogline est un biomarqueur de la pré-éclampsie dont les taux circulants augmentent avec le risque de développer des complications fœtales et maternelles (Rana et al., 2012). L'endogline étant le corécepteur de ALK1, il serait intéressant de doser ALK1 dans une cohorte de femmes pré-éclampsiques.

Par ailleurs, nous avons déjà réalisé des dosages dans 2 cohortes humaines : une de patients atteints de cancer colorectal et traités par Avastin (Cohorte AVECC, protocole Roche) ; et une de patients atteints de la maladie de Rendu-Osler également traités par Avastin (Cohorte Metafore, CHU Lyon) (Dupuis-Girod et al., 2012). Ces deux cohortes ont été dosées avec l'Elisa BMP9 et l'Elisa ALK1 afin de savoir si les taux circulants de ces protéines pouvaient être des marqueurs prédictifs de réponse au traitement. Des résultats préliminaires intéressants montrent une corrélation positive entre les taux de sALK1 et de BMP9 dans la cohorte AVECC. Cette corrélation n'est pas retrouvée dans la cohorte Metafore. Dans l'hypothèse d'un effet inhibiteur de sALK1 sur BMP9, il serait intéressant de doser cette cohorte en dosage biologique (dosage de BMP9 actif) pour savoir si une corrélation négative est retrouvée.

# CONCLUSION

Les résultats obtenus dans le cadre de mes travaux de thèse sont schématisés dans la Figure 63. Dans ce schéma général, les apports de mon travail sont représentés en rouge ; les questions qu'il pose et les perspectives qu'il ouvre, sont en vert.

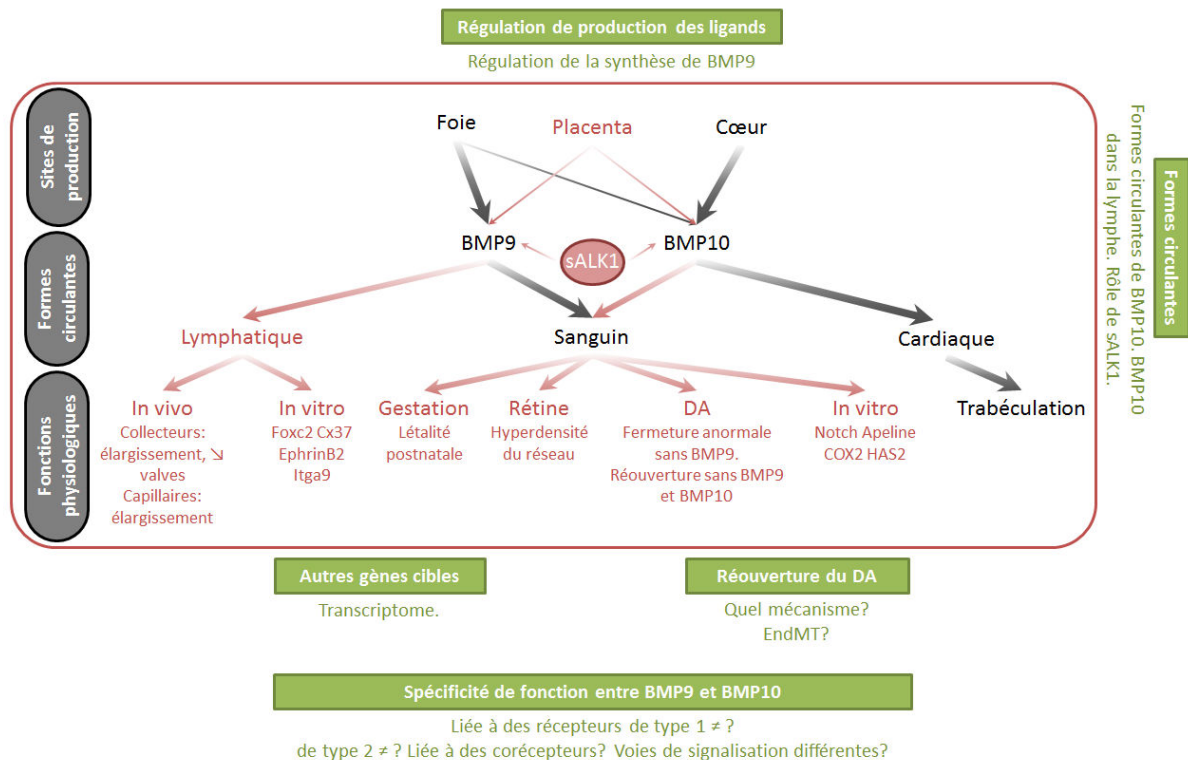


Figure 63 Schéma de l'implication de BMP9 et de BMP10 dans les remodelages vasculaires périnataux.

Ce schéma général permet de situer les résultats de ce travail de thèse à différents niveaux. Le premier niveau est celui des sites de production de BMP9 et de BMP10. Un nouveau site de production de BMP9 et de BMP10 a été mis en évidence, il s'agit du placenta.

Les formes circulantes des protéines constituent un second niveau, auquel la découverte de la forme soluble de ALK1 est l'apport important de ma thèse. J'ai également participé au travail de Marie Bidart qui a détaillé les différentes formes de BMP9 présentes dans le plasma (Bidart et al., 2012).

Au niveau des fonctions physiologiques, l'implication de BMP9 dans le développement du réseau lymphatique est une avancée importante puisque c'est la première fois qu'un facteur de croissance circulant est impliqué dans le développement des valves. Concernant le réseau sanguin, mon travail a permis de détailler les fonctions de BMP9 et de BMP10 dans la vascularisation de la

répine. Bien que devant être complétés, les résultats obtenus ont permis de découvrir l'implication de BMP9 et de BMP10 dans la gestation. Pour finir, l'implication de BMP9 et de BMP10 dans la fermeture du canal artériel apporte un nouvel éclairage à ce processus physiologique puisque c'est la première fois qu'un facteur de croissance circulant est impliqué dans le remodelage de ce vaisseau en un ligament.

Les perspectives propres à chacun de ces points ont été déjà détaillées dans la partie résultats. Les perspectives générales, qui concernent les spécificités de fonctions de BMP9 et de BMP10 vont être détaillées dans la prochaine et dernière partie.



# PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de cette thèse, ainsi que ceux d'autres groupes montrent des spécificités et des redondances dans les effets de BMP9 et de BMP10 dont les bases moléculaires restent une question ouverte.

## Régulation de gènes

L'ensemble de ce travail de thèse a mis en évidence des régulations particulières de gènes dans les compartiments endothéliaux lymphatique et sanguin (Figure 64). Ces régulations sont-elles pour autant spécifiques à chacun de ces compartiments?

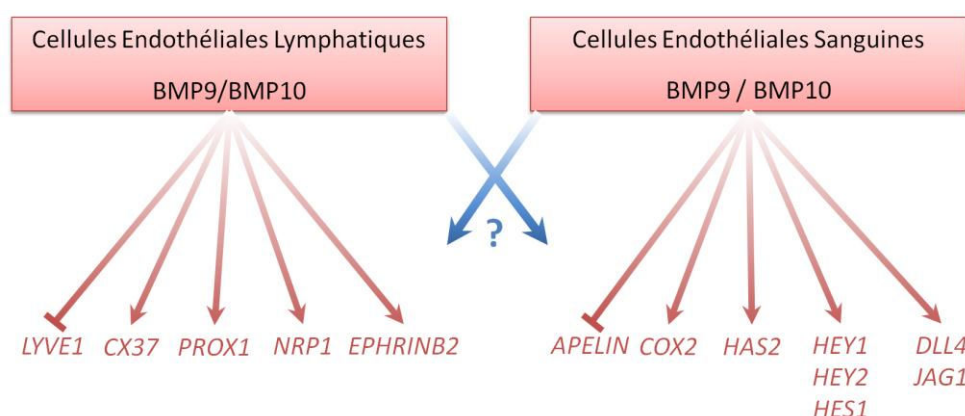


Figure 64 Les nouvelles régulations de gènes mises en évidence in vitro en fonction du caractère lymphatique ou sanguin des cellules endothéliales.

A ce jour, nous n'avons pas trouvé de gène qui soit régulé par BMP9 et BMP10 dans les LEC, et qui ne le soit pas dans les BEC. Bien que tous les gènes n'aient pas été testés, ceux qui l'ont été se comportent de la même manière dans les BEC que dans les LEC. C'est notamment le cas de *LYVE1* et de *CX37* dans les BEC. *EPHRINB2* est déjà décrit comme étant régulé par BMP9 (Kim et al., 2012). *PROX1* et *NRP1* n'ont pas été testés. La régulation in vitro de gènes « lymphatiques » par les BEC interroge sur les conséquences in vivo. Il y a fort à parier que ces régulations puissent avoir des conséquences sur le développement des valves veineuses, ce qui pourrait être examiné chez nos souris *Bmp9-KO*. Il faudrait examiner les régulations de *PROX1*, *ITGA9* et de *VEGFR3* dans les BEC pour savoir si ces gènes impliqués dans le développement des valves lymphatiques et veineuses (Bazigou et al., 2011) sont aussi régulés par BMP9 et BMP10 dans les BEC.

La régulation de l'*APELIN*, *COX2*, *HAS2* et des gènes cibles de la voie NOTCH n'a pas été examinée dans les LEC, et il serait intéressant de le faire. Il est fort possible que ces gènes soient aussi des cibles de BMP9 et de BMP10 dans les LEC. L'implication de la voie NOTCH dans le développement lymphatique a déjà été démontrée in vivo et le blocage de la voie NOTCH in vitro entraîne une inhibition de *LYVE1* (Niessen et al., 2011). Pour notre part, nous démontrons plutôt une activation de la voie NOTCH par BMP9 et BMP10 (dans les BEC) et une inhibition de *LYVE1* (dans les LEC). Ces données sont à première vue contradictoires et ne plaident donc pas pour une régulation

de la voie NOTCH par BMP9 et BMP10 dans les LEC. Mais un examen plus approfondi montre de fines régulation de la voie NOTCH par BMP9 et BMP10. *DLL4* est par exemple induit avec des stimulations courtes et réprimé lorsque la durée de stimulation augmente. Cet exemple illustre la complexité de la régulation de la voie NOTCH par BMP9 et BMP10. Seule une étude approfondie permettrait de révéler une différence dans les voies de signalisation mises en jeu entre les BEC et les LEC.

Dans les LEC, in vitro, BMP10 régule les mêmes gènes que BMP9. Or, in vivo, les souris *Bmp9-KO* sont incapables, au niveau lymphatique, de compenser l'absence de BMP9 par BMP10. Ces données plaident pour une spécificité de BMP9 et de BMP10 qui se ferait au niveau de la protéine elle-même (forme circulante active ou pas ?, activation locale ?), plutôt qu'au niveau des gènes régulés. Il faut rappeler ici que nos expériences in vitro utilisent la forme recombinante mature de BMP9 et de BMP10. Or, ce ne sont pas forcément ces formes qui circulent dans le sang.

En conclusion, les régulations de gènes par BMP9 et BMP10 seraient identiques dans les BEC et les LEC, en tout cas pour les modèles cellulaires que nous utilisons (HPAEC et LEC). Les spécificités d'action de BMP9 et de BMP10 seraient plutôt liées à l'activation locale des protéines et à la présence de combinaisons particulières de récepteurs dans les territoires endothéliaux précis.

### *Les spécificités des territoires endothéliaux*

Les travaux de Chen et al. (Chen et al., 2013) reprennent pour partie exactement les expériences que nous avons faites pour démontrer l'implication de BMP9 et de BMP10 dans la vascularisation postnatale de la rétine et conduisent aux mêmes conclusions. Par contre, les données sur la vascularisation lymphatique, ne recoupent pas les nôtres. Nos résultats suggèrent des spécificités sanguines et lymphatiques dans les effets de BMP9 et de BMP10. Chen et ses collaborateurs suggèrent eux une spécificité temporelle de BMP10 en plus de sa spécificité cardiaque. Ils montrent en effet que BMP10 est produit plus précocement (E8.5) que BMP9, qui est présent à des taux élevés après E11. Ils appuient leur démonstration avec une souris knock-in dans laquelle la séquence de BMP9 remplace celle de BMP10. Ces souris meurent de défauts cardiaques tardifs, qui surviennent à partir de E16.5. Les défauts plus précoces sont eux compensés par la présence ectopique de BMP9.

La spécificité temporelle de BMP9 et de BMP10 est également suggérée dans un modèle de poisson zèbre, de même que des spécificités spatiales, liées au caractère veineux ou artériel de l'endothélium. En effet, l'absence de BMP9 aurait uniquement des effets sur le remodelage des veines (Laux et al., 2013). Il faut noter que chez le poisson zèbre, l'invalidation de *Bmp9* en plus de *Bmp10* n'aggrave pas le phénotype de la vascularisation des artères du crâne. Par contre, l'injection des protéines recombinantes rhBMP9 ou rhBMP10 est capable de restaurer le phénotype d'invalidation de *Bmp10* (Laux et al., 2013).

Les bases moléculaires des spécificités de BMP9 et de BMP10 pourraient avoir pour origines l'affinité différente des ligands pour leurs récepteurs ou l'activation des ligands.

*Affinités différentes pour les récepteurs :*

Les affinités relatives des 2 ligands vis-à-vis de leurs récepteurs de type II constituent une piste. Il est admis que BMP9 et BMP10 ne possèdent pas les mêmes affinités pour les récepteurs de type 2 (Townson et al., 2012). L'expression différentielle de récepteurs de type 2 à la surface de différents types cellulaires va donc clairement pouvoir influencer la spécificité des effets de BMP9 et de BMP10. Il en va de même pour les récepteurs de type I. BMP9 et BMP10 se lient à ALK1 avec une affinité bien supérieure à celle qu'ils ont pour ALK2, ALK3 et ALK6.

Le corécepteur Endogline joue aussi potentiellement un rôle dans cette spécificité. L'Eng-Fc se lie spécifiquement à BMP9 et BMP10 et le site d'interaction BMP9/Eng est le même que celui de ACTR2B-Fc (Castonguay et al., 2011). Il serait intéressant d'étendre ces expériences à BMP10 et aux autres récepteurs de type 2 pour explorer plus en détail cette piste.

Le recrutement de différents récepteurs peut mobiliser des voies de signalisation distinctes. Nous avons notamment montré que la stimulation des CE induisait les gènes de la voie NOTCH ainsi que l'Apeline (Ricard et al., 2012). Or, la voie NOTCH régule aussi le développement lymphatique postnatal (Niessen et al., 2011). Pour ce qui est de l'Apeline, elle semble posséder un rôle dans le développement de l'obésité en lien avec une modification du réseau lymphatique (Sawane et al., 2013). Dans ce cadre, il pourrait être intéressant de savoir si la stimulation des LEC et des BEC avec BMP9 et BMP10 entraîne les mêmes réponses transcriptionnelles des cibles de la voie NOTCH.

#### *Activation des ligands*

La spécificité d'action de BMP9 sur le réseau lymphatique est aussi potentiellement liée à l'absence de BMP10 dans la lymphe. Nous n'avons en effet pas encore vérifié que BMP10 (ou BMP9) étaient bien présents dans la lymphe. Dans l'hypothèse la plus probable que BMP9 et BMP10 soient des composants de la lymphe, reste posée la question de leur activation. Dans un modèle cellulaire C2C12, BMP10 est inactif avec son prodomaine (Sengle et al., 2011), et BMP10 est présent dans le plasma sous une forme inactive (Ricard et al., 2012). Ce n'est pas le cas de BMP9 qui circule sous une forme active (Bidart et al., 2012). Il est envisageable que BMP10 ne soit activé que localement et que les protéases activatrices de BMP10 ne soient pas exprimées par les LEC (seule BMP1 est décrite pour activer BMP10 (Sengle et al., 2011)). L'étude précise des formes circulantes de BMP10 telle qu'elle a été réalisée pour BMP9 (Bidart et al., 2012) permettrait probablement de mieux comprendre les spécificités d'action de BMP9 et de BMP10.

## Liste des Abréviations

---

ACE : agiotensin converting enzyme	HMVECd: human dermal microvascular endothelial cells
ADAM: a disintegrin and metalloproteinase	HPAEC: human pulmonary arterial endothelial cell
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdien	HPGD: hydroxyprostaglandin deshydrogenase
ALK: activin receptor-like kinase	HUAEC: human umbilical arterial endothelial cells
ALK1 ICD: ALK1 intra cellular domain	HUVEC: human umbilical venous endothelial cells
AMPc : AMP cyclique	Id: Inhibiteurs de différenciation
Ang-2: angiopoïétine-2	IEL: lame élastique interne
AVC: atrio ventricular canal	Ihh: indian hedghog
BAF: Brg1/Brm-associated factor	ILK: Integrin Linked Kinase
BEC: blood endothelial cell	IP3: inositol 3-phosphate
BFCN: basal forebrain cholinergic neurons	Itga- $\alpha$ 9: intégrine- $\alpha$ 9
BMP: bone morphogenetic protein	JNK: c-Jun N-terminal kinases
BRE: BMP responsive element	LEC: lymphatic endothelial cell
CAM : membrane chorioallantoïdienne	LIMK-1: LIM kinase-1
CE: cellule endothéliale	LTBP: latent TGF $\beta$ binding protein
CO : monoxyde de carbone	Lyve-1: lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
CREB: cAMP responsive element binding protein	MAGP : microfibrilles associated glycoproteins
CT: cytotrophoblastes	MB:membrane basale
DA: Ductus Arteriosus	MCP1: monocyte chemotactic protein1
DII4: Delta-like 4	MEC: matrice extracellulaire
Drp1: dynamin related protéin	MLCK: myosin light chain kinase
E: jour embryonnaire	MLCP: myosine light chain phosphatase
EFS : etablissement français du sang	MMP: métalloprotéase
Emiline-1: elastin microfibril interface located protein 1	mTor: mammalian target of rapamycin
EndMT: endothelial-to-mesenchymal transition	MWCO: molecular weight cutt off
EP, IP, TP: récepteurs des PGE, des PGI, du thromboxane	NFATc1: nuclear factor of activated T cells
Erk: extracellular-signal-regulated kinases	NGF: nerve growth factor
ET-1 : endothéline-1	NO: monoxyde d'azote
ETA : récepteur de l'endothéline-1	NRP: neuropiline
FGF: fibroblasts growth factor	OFT: out flow tract
FNEIIIA: fibronectine EIIIA	OKMS: Oct4, Klf4, c-Myc Sox2
Foxc2: Forkhead box protein C2	P: jour postnatal
GAG: glycosaminoglycan	PCP: Planar Cell Polarity
GMPc : GMP cyclique	PDGF-BB: platelet-derived growth factor BB
HA: hyaluronicacide	PECAM: platelet-endothelial cell adhesion molecule
HAS: hyaluronicacide synthase	PG: prostaglandine
hCG: human chorionic gonadotropin	

PGDH : prostaglandine déshydrogénase  
PGH: placental growth hormone  
PGI : prostacycline  
PI3K: phosphatidylinositol 3-phosphate kinase  
PMA: phorbol myristate acetate  
PO2 : pression partielle en oxygène  
PP2A: protein phosphatase 2A  
Prox1: prospero homeobox protein 1  
ROCK-1: rho-associated protein kinase 1  
sALK1 : ALK1 soluble  
sBG: betaglycan soluble  
Sema3A: semaphorine 3A  
sEng: endogline soluble

shRNA: short hairpin RNA  
Si Sc: Si Scramble  
SM-MHC : smooth muscle myosin heavy chain  
SMC: smooth muscle cells  
ST: syncytiotrophoblaste  
TAAD: thoracic aortic aneurysm and dissection  
TCA: acide trichloro acétique  
TEM : microscopie électronique à transmission  
TGF $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$   
Vangl2: Van Gogh Like  
VE-cadhérine: vascular endothelial cadherin  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
VEGFR: VEGF receptor

## Bibliographie

---

- Agren, P., S. van der Sterren, A.L. Cogolludo, G. Frazziano, J.G. de Mey, C.E. Blanco, and E. Villamor. 2008. Developmental changes in endothelium-dependent relaxation of the chicken ductus arteriosus. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 59:55-76.
- Aird, W.C. 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation research*. 100:174-190.
- Alders, M., B.M. Hogan, E. Gjini, F. Salehi, L. Al-Gazali, E.A. Hennekam, E.E. Holmberg, M.M. Mannens, M.F. Mulder, G.J. Offerhaus, T.E. Prescott, E.J. Schroor, J.B. Verheij, M. Witte, P.J. Zwijnenburg, M. Vikkula, S. Schulte-Merker, and R.C. Hennekam. 2009. Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nature genetics*. 41:1272-1274.
- Alsat, E., A. Malassine, A. Tarrade, P. Merviel, and D. Evain-Brion. 1999. The human cytotrophoblast: an overview of recent data. *MS-Med Sci*. 15:1236-1243.
- Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development*. 22:1276-1312.
- Arroyo, A.G., and M.L. Iruela-Arispe. 2010. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular research*. 86:226-235.
- Arthur, H.M., J. Ure, A.J. Smith, G. Renforth, D.I. Wilson, E. Torsney, R. Charlton, D.V. Parums, T. Jowett, D.A. Marchuk, J. Burn, and A.G. Diamond. 2000. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Developmental biology*. 217:42-53.
- Babitt, J.L., F.W. Huang, D.M. Wrighting, Y. Xia, Y. Sidis, T.A. Samad, J.A. Campagna, R.T. Chung, A.L. Schneyer, C.J. Woolf, N.C. Andrews, and H.Y. Lin. 2006. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature genetics*. 38:531-539.
- Baluk, P., J. Fuxe, H. Hashizume, T. Romano, E. Lashnits, S. Butz, D. Vestweber, M. Corada, C. Molendini, E. Dejana, and D.M. McDonald. 2007. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *The Journal of experimental medicine*. 204:2349-2362.
- Baluk, P., and D.M. McDonald. 2008. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1131:1-12.
- Baluk, P., T. Tammela, E. Ator, N. Lyubynska, M.G. Achen, D.J. Hicklin, M. Jeltsch, T.V. Petrova, B. Pytowski, S.A. Stacker, S. Yla-Herttuala, D.G. Jackson, K. Alitalo, and D.M. McDonald. 2005. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 115:247-257.
- Bazigou, E., O.T. Lyons, A. Smith, G.E. Venn, C. Cope, N.A. Brown, and T. Makinen. 2011. Genes regulating lymphangiogenesis control venous valve formation and maintenance in mice. *The Journal of clinical investigation*. 121:2984-2992.
- Bazigou, E., and T. Makinen. 2013. Flow control in our vessels: vascular valves make sure there is no way back. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 70:1055-1066.
- Bazigou, E., S. Xie, C. Chen, A. Weston, N. Miura, L. Sorokin, R. Adams, A.F. Muro, D. Sheppard, and T. Makinen. 2009. Integrin-alpha9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Developmental cell*. 17:175-186.
- Benedito, R., C. Roca, I. Sorensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger, and R.H. Adams. 2009. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*. 137:1124-1135.
- Benjamin, L.E., I. Hemo, and E. Keshet. 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 125:1591-1598.

- Berghorn, K.A., P.A. Clark-Campbell, L. Han, M. McGrattan, R.S. Weiss, and M.S. Roberson. 2006. Smad6 represses Dlx3 transcriptional activity through inhibition of DNA binding. *The Journal of biological chemistry*. 281:20357-20367.
- Bergwerff, M., M.C. DeRuiter, and A.C. Gittenberger-de Groot. 1999. Comparative anatomy and ontogeny of the ductus arteriosus, a vascular outsider. *Anatomy and embryology*. 200:559-571.
- Bertozzi, C.C., A.A. Schmaier, P. Mericko, P.R. Hess, Z. Zou, M. Chen, C.Y. Chen, B. Xu, M.M. Lu, D. Zhou, E. Sebzda, M.T. Santore, D.J. Merianos, M. Stadtfeld, A.W. Flake, T. Graf, R. Skoda, J.S. Maltzman, G.A. Koretzky, and M.L. Kahn. 2010. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood*. 116:661-670.
- Bessa, P.C., M.T. Cerqueira, T. Rada, M.E. Gomes, N.M. Neves, A. Nobre, R.L. Reis, and M. Casal. 2009. Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human BMP-4, -9, -10, -11 and -14. *Protein expression and purification*. 63:89-94.
- Bidart, M., N. Ricard, S. Levet, M. Samson, C. Mallet, L. David, M. Subileau, E. Tillet, J.J. Feige, and S. Bailly. 2012. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 69:313-324.
- Bokenkamp, R., A.C. Gittenberger-De Groot, C.J. Van Munsteren, R.W. Grauss, J. Ottenkamp, and M.C. Deruiter. 2006. Persistent ductus arteriosus in the Brown-Norway inbred rat strain. *Pediatric research*. 60:407-412.
- Bos, F.L., M. Caunt, J. Peterson-Maduro, L. Planas-Paz, J. Kowalski, T. Karpanen, A. van Impel, R. Tong, J.A. Ernst, J. Korving, J.H. van Es, E. Lammert, H.J. Duckers, and S. Schulte-Merker. 2011. CCBE1 is essential for mammalian lymphatic vascular development and enhances the lymphangiogenic effect of vascular endothelial growth factor-C in vivo. *Circulation research*. 109:486-491.
- Boucher, J., T. Gridley, and L. Liaw. 2012. Molecular pathways of notch signaling in vascular smooth muscle cells. *Frontiers in physiology*. 3:81.
- Boudreau, N., N. Clausell, J. Boyle, and M. Rabinovitch. 1992. Transforming growth factor-beta regulates increased ductus arteriosus endothelial glycosaminoglycan synthesis and a post-transcriptional mechanism controls increased smooth muscle fibronectin, features associated with intimal proliferation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 67:350-359.
- Bourdeau, A., D.J. Dumont, and M. Letarte. 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The Journal of clinical investigation*. 104:1343-1351.
- Bouvree, K., I. Brunet, R. Del Toro, E. Gordon, C. Prahst, B. Cristofaro, T. Mathivet, Y. Xu, J. Soueid, V. Fortuna, N. Miura, M.S. Aigrot, C.H. Maden, C. Ruhrberg, J.L. Thomas, and A. Eichmann. 2012. Semaphorin3A, Neuropilin-1, and PlexinA1 are required for lymphatic valve formation. *Circulation research*. 111:437-445.
- Brown, M.A., Q. Zhao, K.A. Baker, C. Naik, C. Chen, L. Pukac, M. Singh, T. Tsareva, Y. Parice, A. Mahoney, V. Roschke, I. Sanyal, and S. Choe. 2005. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *The Journal of biological chemistry*. 280:25111-25118.
- Calder, P.C. 2005. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochemical Society transactions*. 33:423-427.
- Camenisch, T.D., A.P. Spicer, T. Brehm-Gibson, J. Biesterfeldt, M.L. Augustine, A. Calabro, Jr., S. Kubalak, S.E. Klewer, and J.A. McDonald. 2000. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *The Journal of clinical investigation*. 106:349-360.
- Caperuto, L.C., G.F. Anhe, T.D. Cambiaghi, E.H. Akamine, D. do Carmo Buonfiglio, J. Cipolla-Neto, R. Curi, and S. Bordin. 2008. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*. 149:6326-6335.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. 6:389-395.



- Carmeliet, P., and R.K. Jain. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 473:298-307.
- Carmeliet, P., and M. Tessier-Lavigne. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 436:193-200.
- Carroll, S.B. 2001. Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature*. 409:1102-1109.
- Castonguay, R., E.D. Werner, R.G. Matthews, E. Presman, A.W. Mulivor, N. Solban, D. Sako, R.S. Pearsall, K.W. Underwood, J. Seehra, R. Kumar, and A.V. Grinberg. 2011. Soluble endoglin specifically binds BMP9/BMP10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation and suppresses tumor growth. *The Journal of biological chemistry*.
- Chakraborty, S., and K.E. Yutzey. 2012. Tbx20 regulation of cardiac cell proliferation and lineage specialization during embryonic and fetal development in vivo. *Developmental biology*. 363:234-246.
- Chang, H., D. Huylebroeck, K. Verschueren, Q. Guo, M.M. Matzuk, and A. Zwijsen. 1999. Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development*. 126:1631-1642.
- Chang, H., A. Zwijsen, H. Vogel, D. Huylebroeck, and M.M. Matzuk. 2000. Smad5 is essential for left-right asymmetry in mice. *Developmental biology*. 219:71-78.
- Chang, H.Y., J. Locker, R. Lu, and V.L. Schuster. 2010. Failure of postnatal ductus arteriosus closure in prostaglandin transporter-deficient mice. *Circulation*. 121:529-536.
- Chen, C., K.J. Grzegorzewski, S. Barash, Q. Zhao, H. Schneider, Q. Wang, M. Singh, L. Pukac, A.C. Bell, R. Duan, T. Coleman, A. Duttaroy, S. Cheng, J. Hirsch, L. Zhang, Y. Lazard, C. Fischer, M.C. Barber, Z.D. Ma, Y.Q. Zhang, P. Reavey, L. Zhong, B. Teng, I. Sanyal, S.M. Ruben, O. Blondel, and C.E. Birse. 2003. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol*. 21:294-301.
- Chen, H., J. Brady Ridgway, T. Sai, J. Lai, S. Warming, H. Chen, M. Roose-Girma, G. Zhang, W. Shou, and M. Yan. 2013. Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Chen, H., S. Shi, L. Acosta, W. Li, J. Lu, S. Bao, Z. Chen, Z. Yang, M.D. Schneider, K.R. Chien, S.J. Conway, M.C. Yoder, L.S. Haneline, D. Franco, and W. Shou. 2004. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*. 131:2219-2231.
- Chen, H., W. Yong, S. Ren, W. Shen, Y. He, K.A. Cox, W. Zhu, W. Li, M. Soonpaa, R.M. Payne, D. Franco, L.J. Field, V. Rosen, Y. Wang, and W. Shou. 2006. Overexpression of bone morphogenetic protein 10 in myocardium disrupts cardiac postnatal hypertrophic growth. *The Journal of biological chemistry*. 281:27481-27491.
- Cheung, C., and S. Sinha. 2011. Human embryonic stem cell-derived vascular smooth muscle cells in therapeutic neovascularisation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 51:651-664.
- Choi, M.E. 1999. Cloning and characterization of a naturally occurring soluble form of TGF-beta type I receptor. *The American journal of physiology*. 276:F88-95.
- Clarijs, R., L. Schalkwijk, U.B. Hofmann, D.J. Ruiter, and R.M. de Waal. 2002. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumor microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma. *Cancer research*. 62:7059-7065.
- Cleaver, O., and D.A. Melton. 2003. Endothelial signaling during development. *Nature medicine*. 9:661-668.
- Clyman, R.I., F. Mauray, C. Roman, A.M. Rudolph, and M.A. Heymann. 1980. Circulating prostaglandin E2 concentrations and patent ductus arteriosus in fetal and neonatal lambs. *The Journal of pediatrics*. 97:455-461.
- Clyman, R.I., S.R. Seidner, H. Kajino, C. Roman, C.J. Koch, N. Ferrara, N. Waleh, F. Mauray, Y.Q. Chen, E.A. Perket, and T. Quinn. 2002. VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 282:R199-206.

- Coceani, F., D. Huhtanen, N.C. Hamilton, I. Bishai, and P.M. Olley. 1986. Involvement of intramural prostaglandin E2 in prenatal patency of the lamb ductus arteriosus. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 64:737-744.
- Coceani, F., L. Kelsey, E. Seidlitz, G.S. Marks, B.E. McLaughlin, H.J. Vreman, D.K. Stevenson, M. Rabinovitch, and C. Ackerley. 1997. Carbon monoxide formation in the ductus arteriosus in the lamb: implications for the regulation of muscle tone. *British journal of pharmacology*. 120:599-608.
- Coceani, F., Y. Liu, E. Seidlitz, L. Kelsey, T. Kuwaki, C. Ackerley, and M. Yanagisawa. 1999. Endothelin A receptor is necessary for O(2) constriction but not closure of ductus arteriosus. *The American journal of physiology*. 277:H1521-1531.
- Coceani, F., and P.M. Olley. 1973. The response of the ductus arteriosus to prostaglandins. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 51:220-225.
- Coceani, F., P.M. Olley, and E. Bodach. 1975. Lamb ductus arteriosus: effect of prostaglandin synthesis inhibitors on the muscle tone and the response to prostaglandin E2. *Prostaglandins*. 9:299-308.
- Coggins, K.G., A. Latour, M.S. Nguyen, L. Audoly, T.M. Coffman, and B.H. Koller. 2002. Metabolism of PGE2 by prostaglandin dehydrogenase is essential for remodeling the ductus arteriosus. *Nature medicine*. 8:91-92.
- Compton, L.A., D.A. Potash, C.B. Brown, and J.V. Barnett. 2007. Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circulation research*. 101:784-791.
- Connolly, S.E., T.A. Hores, L.E. Smith, and P.A. D'Amore. 1988. Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvascular research*. 36:275-290.
- Constam, D.B., and E.J. Robertson. 1999. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *The Journal of cell biology*. 144:139-149.
- Corradini, E., J.L. Babitt, and H.Y. Lin. 2009. The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 20:389-398.
- Corti, P., S. Young, C.Y. Chen, M.J. Patrick, E.R. Rochon, K. Pekkan, and B.L. Roman. 2011. Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. *Development*. 138:1573-1582.
- Cox, C.M., and T.J. Poole. 2000. Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 218:371-382.
- Cunha, S.I., E. Pardali, M. Thorikay, C. Anderberg, L. Hawinkels, M.J. Goumans, J. Seehra, C.H. Heldin, P. ten Dijke, and K. Pietras. 2010. Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 207:85-100, S101-105.
- D'Amore, P.A., and S.R. Smith. 1993. Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. *Growth factors*. 8:61-75.
- Dagenais, S.L., R.L. Hartsough, R.P. Erickson, M.H. Witte, M.G. Butler, and T.W. Glover. 2004. Foxc2 is expressed in developing lymphatic vessels and other tissues associated with lymphedema-distichiasis syndrome. *Gene expression patterns : GEP*. 4:611-619.
- Danussi, C., P. Spessotto, A. Petrucco, B. Wassermann, P. Sabatelli, M. Montesi, R. Doliana, G.M. Bressan, and A. Colombatti. 2008. Emilin1 deficiency causes structural and functional defects of lymphatic vasculature. *Molecular and cellular biology*. 28:4026-4039.
- Darland, D.C., and P.A. D'Amore. 2001. Cell-cell interactions in vascular development. *Current topics in developmental biology*. 52:107-149.
- David, L., J.J. Feige, and S. Bailly. 2009. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*. 20:203-212.
- David, L., C. Mallet, M. Keramidas, N. Lamande, J.M. Gasc, S. Dupuis-Girod, H. Plauchu, J.J. Feige, and S. Bailly. 2008. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circulation research*. 102:914-922.

- David, L., C. Mallet, S. Mazerbourg, J.J. Feige, and S. Bailly. 2007a. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 109:1953-1961.
- David, L., C. Mallet, B. Vailhe, S. Lamouille, J.J. Feige, and S. Bailly. 2007b. Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J Cell Physiol*. 213:484-489.
- Davis, S., T.H. Aldrich, P.F. Jones, A. Acheson, D.L. Compton, V. Jain, T.E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P.C. Maisonpierre, and G.D. Yancopoulos. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 87:1161-1169.
- de Reeder, E.G., C.J. van Munsteren, R.E. Poelmann, D.F. Patterson, and A.C. Gittenberger-de Groot. 1990. Changes in distribution of elastin and elastin receptor during intimal cushion formation in the ductus arteriosus. *Anatomy and embryology*. 182:473-480.
- de Vries, C., J.A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, and L.T. Williams. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 255:989-991.
- Dellinger, M., R. Hunter, M. Bernas, N. Gale, G. Yancopoulos, R. Erickson, and M. Witte. 2008. Defective remodeling and maturation of the lymphatic vasculature in Angiopoietin-2 deficient mice. *Developmental biology*. 319:309-320.
- Delot, E.C., M.E. Bahamonde, M. Zhao, and K.M. Lyons. 2003. BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart. *Development*. 130:209-220.
- Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 425:577-584.
- Di Guglielmo, G.M., C. Le Roy, A.F. Goodfellow, and J.L. Wrana. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology*. 5:410-421.
- Drayton, M.R., and R. Skidmore. 1987. Ductus arteriosus blood flow during first 48 hours of life. *Archives of disease in childhood*. 62:1030-1034.
- Dupuis-Girod, S., S. Bailly, and H. Plauchu. 2010. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): from molecular biology to patient care. *J Thromb Haemost*. 8:1447-1456.
- Dupuis-Girod, S., I. Ginon, J.C. Saurin, D. Marion, E. Guillot, E. Decullier, A. Roux, M.F. Carette, B. Gilbert-Dussardier, P.Y. Hatron, P. Lacombe, B. Lorcerie, S. Riviere, R. Corre, S. Giraud, S. Bailly, G. Paintaud, D. Ternant, P.J. Valette, H. Plauchu, and F. Faure. 2012. Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic vascular malformations and high cardiac output. *JAMA*. 307:948-955.
- Dyer, M.A., S.M. Farrington, D. Mohn, J.R. Munday, and M.H. Baron. 2001. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*. 128:1717-1730.
- Echtler, K., K. Stark, M. Lorenz, S. Kerstan, A. Walch, L. Jennen, M. Rudelius, S. Seidl, E. Kremmer, N.R. Emambokus, M.L. von Bruehl, J. Frampton, B. Isermann, O. Genzel-Boroviczeny, C. Schreiber, J. Mehilli, A. Kastrati, M. Schwaiger, R.A. Shivdasani, and S. Massberg. 2010. Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nature medicine*. 16:75-82.
- El-Bizri, N., C. Guignabert, L. Wang, A. Cheng, K. Stankunas, C.P. Chang, Y. Mishina, and M. Rabinovitch. 2008. SM22alpha-targeted deletion of bone morphogenetic protein receptor 1A in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis. *Development*. 135:2981-2991.
- Epstein, J.A. 2010. Franklin H. Epstein Lecture. Cardiac development and implications for heart disease. *The New England journal of medicine*. 363:1638-1647.
- Fan, F.L., S. Zhu, L.H. Chen, Y.L. Zou, L.H. Fan, J.H. Kang, A.Q. Ma, and Y.F. Guan. 2010. Role of prostaglandin E and its receptors in the process of ductus arteriosus maturation and functional closure in the rabbit. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 37:574-580.
- Fantin, A., J.M. Vieira, G. Gestri, L. Denti, Q. Schwarz, S. Prykhodzhiy, F. Peri, S.W. Wilson, and C. Ruhrberg. 2010. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*. 116:829-840.

- Favre, C.J., M. Mancuso, K. Maas, J.W. McLean, P. Baluk, and D.M. McDonald. 2003. Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 285:H1917-1938.
- Feng, X., L.T. Krebs, and T. Gridley. 2010. Patent ductus arteriosus in mice with smooth muscle-specific Jag1 deletion. *Development*. 137:4191-4199.
- Feng, X.H., and R. Derynck. 2005. Specificity and versatility in tgfbeta signaling through Smads. *Annual review of cell and developmental biology*. 21:659-693.
- Fiedler, U., Y. Reiss, M. Scharpfenecker, V. Grunow, S. Koidl, G. Thurston, N.W. Gale, M. Witzenth, S. Rosseau, N. Suttorp, A. Sobke, M. Herrmann, K.T. Preissner, P. Vajkoczy, and H.G. Augustin. 2006. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature medicine*. 12:235-239.
- Foldi, M. 2004. Remarks concerning the consensus document (CD) of the International Society of Lymphology "The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema". *Lymphology*. 37:168-173.
- Fournier, T., V. Tsatsaris, K. Handschuh, and D. Evain-Brion. 2007. PPARs and the placenta. *Placenta*. 28:65-76.
- Francois, M., A. Caprini, B. Hosking, F. Orsenigo, D. Wilhelm, C. Browne, K. Paavonen, T. Karnezis, R. Shayan, M. Downes, T. Davidson, D. Tutt, K.S. Cheah, S.A. Stacker, G.E. Muscat, M.G. Achen, E. Dejana, and P. Koopman. 2008. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*. 456:643-647.
- Fritz-Six, K.L., W.P. Dunworth, M. Li, and K.M. Caron. 2008. Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *The Journal of clinical investigation*. 118:40-50.
- Fuchs, O., O. Simakova, P. Klener, J. Cmejlova, J. Zivny, J. Zavadil, and T. Stopka. 2002. Inhibition of Smad5 in human hematopoietic progenitors blocks erythroid differentiation induced by BMP4. *Blood cells, molecules & diseases*. 28:221-233.
- Fujioka, K., I. Morioka, A. Miwa, S. Morikawa, A. Shibata, N. Yokoyama, and M. Matsuo. 2011. Does thrombocytopenia contribute to patent ductus arteriosus? *Nature medicine*. 17:29-30; author reply 30-21.
- Fujiwara, M., H. Yagi, R. Matsuoka, K. Akimoto, M. Furutani, S. Imamura, R. Uehara, T. Nakayama, A. Takao, M. Nakazawa, and T. Saji. 2008. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMP2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 72:127-133.
- Gaborit, N., R. Sakuma, J.N. Wylie, K.H. Kim, S.S. Zhang, C.C. Hui, and B.G. Bruneau. 2012. Cooperative and antagonistic roles for Irx3 and Irx5 in cardiac morphogenesis and postnatal physiology. *Development*. 139:4007-4019.
- Gale, N.W., and G.D. Yancopoulos. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & development*. 13:1055-1066.
- Gallione, C.J., J.A. Richards, T.G. Letteboer, D. Rushlow, N.L. Prigoda, T.P. Leedom, A. Ganguly, A. Castells, J.K. Ploos van Amstel, C.J. Westermann, R.E. Pyeritz, and D.A. Marchuk. 2006. SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet*. 43:793-797.
- Gallot, D., Sapin, V. 2007. Meance d'accouchement prématuré et marqueurs de rupture prématurée des membranes: de la physiologie au diagnostic. *Spectra Biologie*. 161:59-63.
- Galvin, K.M., M.J. Donovan, C.A. Lynch, R.I. Meyer, R.J. Paul, J.N. Lorenz, V. Fairchild-Huntress, K.L. Dixon, J.H. Dunmore, M.A. Gimbrone, Jr., D. Falb, and D. Huszar. 2000. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nature genetics*. 24:171-174.
- Gamell, C., N. Osses, R. Bartrons, T. Ruckle, M. Camps, J.L. Rosa, and F. Ventura. 2008. BMP 2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *Journal of cell science*. 121:3960-3970.
- Gaussin, V., T. Van de Putte, Y. Mishina, M.C. Hanks, A. Zwijsen, D. Huylebroeck, R.R. Behringer, and M.D. Schneider. 2002. Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-

- specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:2878-2883.
- Georgiades, P., A.C. Ferguson-Smith, and G.J. Burton. 2002. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*. 23:3-19.
- Gerety, S.S., H.U. Wang, Z.F. Chen, and D.J. Anderson. 1999. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Molecular cell*. 4:403-414.
- Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, and C. Betsholtz. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology*. 161:1163-1177.
- Gersony, W.M. 1986. Patent ductus arteriosus in the neonate. *Pediatric clinics of North America*. 33:545-560.
- Gersony, W.M., G.J. Peckham, R.C. Ellison, O.S. Miettinen, and A.S. Nadas. 1983. Effects of indomethacin in premature infants with patent ductus arteriosus: results of a national collaborative study. *The Journal of pediatrics*. 102:895-906.
- Gittenberger-de Groot, A.C., A.J. Moulart, and J.F. Hitchcock. 1980. Histology of the persistent ductus arteriosus in cases of congenital rubella. *Circulation*. 62:183-186.
- Gittenberger-de Groot, A.C., J.L. Strengers, M. Mentink, R.E. Poelmann, and D.F. Patterson. 1985. Histologic studies on normal and persistent ductus arteriosus in the dog. *Journal of the American College of Cardiology*. 6:394-404.
- Goffinet, F., and G. Kayem. 2002. [Diagnosis and prognosis of preterm labor: physical examination and ultrasonography]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 31:5S22-34.
- Gonzalez-Nunez, M., J.M. Munoz-Felix, and J.M. Lopez-Novoa. 2013. The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochimica et biophysica acta*. 1832:1492-1510.
- Goumans, M.J., and C. Mummery. 2000. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *The International journal of developmental biology*. 44:253-265.
- Gournay, V. 2011. The ductus arteriosus: physiology, regulation, and functional and congenital anomalies. *Archives of cardiovascular diseases*. 104:578-585.
- Grego-Bessa, J., L. Luna-Zurita, G. del Monte, V. Bolos, P. Melgar, A. Arandilla, A.N. Garratt, H. Zang, Y.S. Mukoyama, H. Chen, W. Shou, E. Ballestar, M. Esteller, A. Rojas, J.M. Perez-Pomares, and J.L. de la Pompa. 2007. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Developmental cell*. 12:415-429.
- Guo, D.C., H. Pannu, V. Tran-Fadulu, C.L. Papke, R.K. Yu, N. Avidan, S. Bourgeois, A.L. Estrera, H.J. Safi, E. Sparks, D. Amor, L. Ades, V. McConnell, C.E. Willoughby, D. Abuelo, M. Willing, R.A. Lewis, D.H. Kim, S. Scherer, P.P. Tung, C. Ahn, L.M. Buja, C.S. Raman, S.S. Shete, and D.M. Milewicz. 2007. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nature genetics*. 39:1488-1493.
- Gupta, S., A.R. Ramjaun, P. Haiko, Y. Wang, P.H. Warne, B. Nicke, E. Nye, G. Stamp, K. Alitalo, and J. Downward. 2007. Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell*. 129:957-968.
- Hagerling, R., C. Pollmann, M. Andreas, C. Schmidt, H. Nurmi, R.H. Adams, K. Alitalo, V. Andresen, S. Schulte-Merker, and F. Kiefer. 2013. A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. *The EMBO journal*. 32:629-644.
- Hahn, A.W., T.J. Resink, F. Kern, and F.R. Buhler. 1992. Effects of endothelin-1 on vascular smooth muscle cell phenotypic differentiation. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 20 Suppl 12:S33-36.
- Hajj, H., and J.M. Dagle. 2012. Genetics of patent ductus arteriosus susceptibility and treatment. *Seminars in perinatology*. 36:98-104.

- Halbrooks, P.J., R. Ding, J.M. Wozney, and G. Bain. 2007. Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *Journal of molecular signaling*. 2:4.
- Hang, C.T., J. Yang, P. Han, H.L. Cheng, C. Shang, E. Ashley, B. Zhou, and C.P. Chang. 2010. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature*. 466:62-67.
- Harakalova, M., J. van der Smagt, C.G. de Kovel, R. Van't Slot, M. Poot, I.J. Nijman, J. Medic, I. Joziase, J. Deckers, J.W. Roos-Hesselink, M.W. Wessels, H.F. Baars, M.M. Weiss, G. Pals, L. Golmard, X. Jeunemaitre, D. Lindhout, E. Cuppen, and A.F. Baas. 2013. Incomplete segregation of MYH11 variants with thoracic aortic aneurysms and dissections and patent ductus arteriosus. *European journal of human genetics : EJHG*. 21:487-493.
- Harrison, C.A., S.L. Al-Musawi, and K.L. Walton. 2011. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands. *Growth factors*. 29:174-186.
- Harvey, R.P. 2002. Patterning the vertebrate heart. *Nature reviews. Genetics*. 3:544-556.
- Hawinkels, L.J., P. Kuiper, E. Wiercinska, H.W. Verspaget, Z. Liu, E. Pardali, C.F. Sier, and P. ten Dijke. 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer research*. 70:4141-4150.
- Hayashida, K., A.H. Bartlett, Y. Chen, and P.W. Park. 2010. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anatomical record*. 293:925-937.
- He, A., Q. Ma, J. Cao, A. von Gise, P. Zhou, H. Xie, B. Zhang, M. Hsing, D.C. Christodoulou, P. Cahan, G.Q. Daley, S.W. Kong, S.H. Orkin, C.E. Seidman, J.G. Seidman, and W.T. Pu. 2012. Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart. *Circulation research*. 110:406-415.
- He, W., D.C. Dorn, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M.A. Moore, and J. Massague. 2006. Hematopoiesis controlled by distinct TGF-beta and Smad4 branches of the TGF-beta pathway. *Cell*. 125:929-941.
- Hellstrom, M., H. Gerhardt, M. Kalen, X. Li, U. Eriksson, H. Wolburg, and C. Betsholtz. 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 153:543-553.
- Hellstrom, M., M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson, and C. Betsholtz. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 126:3047-3055.
- Hellstrom, M., L.K. Phng, J.J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A.K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M.L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt, and C. Betsholtz. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 445:776-780.
- Herrera, B., M. van Dinther, P. Ten Dijke, and G.J. Inman. 2009. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer research*. 69:9254-9262.
- Herzog, Y., N. Guttman-Raviv, and G. Neufeld. 2005. Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 232:1047-1055.
- Heymann, M.A., and A.M. Rudolph. 1975. Control of the ductus arteriosus. *Physiological reviews*. 55:62-78.
- High, F.A., and J.A. Epstein. 2008. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nature reviews. Genetics*. 9:49-61.
- Hinek, A., R.P. Mecham, F. Keeley, and M. Rabinovitch. 1991. Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin-binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate. *The Journal of clinical investigation*. 88:2083-2094.
- Hirschi, K.K., S.A. Rohovsky, and P.A. D'Amore. 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *The Journal of cell biology*. 141:805-814.

- Hogan, B.L. 1996. Bone morphogenetic proteins in development. *Current opinion in genetics & development*. 6:432-438.
- Hong, Z., S. Kutty, P.T. Toth, G. Marsboom, J.M. Hammel, C. Chamberlain, J.J. Ryan, H.J. Zhang, W.W. Sharp, E. Morrow, K. Trivedi, E.K. Weir, and S.L. Archer. 2013. Role of dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated mitochondrial fission in oxygen sensing and constriction of the ductus arteriosus. *Circulation research*. 112:802-815.
- Hood, J.D., and D.A. Cheresh. 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature reviews. Cancer*. 2:91-100.
- Hope, K.J., and G. Sauvageau. 2011. Roles for MSI2 and PROX1 in hematopoietic stem cell activity. *Current opinion in hematology*. 18:203-207.
- Huang, J., L. Cheng, J. Li, M. Chen, D. Zhou, M.M. Lu, A. Proweller, J.A. Epstein, and M.S. Parmacek. 2008. Myocardin regulates expression of contractile genes in smooth muscle cells and is required for closure of the ductus arteriosus in mice. *The Journal of clinical investigation*. 118:515-525.
- Huang, J., J. Elicker, N. Bowens, X. Liu, L. Cheng, T.P. Cappola, X. Zhu, and M.S. Parmacek. 2012. Myocardin regulates BMP10 expression and is required for heart development. *The Journal of clinical investigation*. 122:3678-3691.
- Huang, Z., D. Wang, K. Ihida-Stansbury, P.L. Jones, and J.F. Martin. 2009. Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Human molecular genetics*. 18:2791-2801.
- Iida, K., H. Koseki, H. Kakinuma, N. Kato, Y. Mizutani-Koseki, H. Ohuchi, H. Yoshioka, S. Noji, K. Kawamura, Y. Kataoka, F. Ueno, M. Taniguchi, N. Yoshida, T. Sugiyama, and N. Miura. 1997. Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis. *Development*. 124:4627-4638.
- Irrthum, A., M.J. Karkkainen, K. Devriendt, K. Alitalo, and M. Vikkula. 2000. Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *American journal of human genetics*. 67:295-301.
- Israel, D.I., J. Nove, K.M. Kerns, R.J. Kaufman, V. Rosen, K.A. Cox, and J.M. Wozney. 1996. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth factors*. 13:291-300.
- Itoh, S., and P. ten Dijke. 2007. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Current opinion in cell biology*. 19:176-184.
- Ivey, K.N., D. Sutcliffe, J. Richardson, R.I. Clyman, J.A. Garcia, and D. Srivastava. 2008. Transcriptional regulation during development of the ductus arteriosus. *Circulation research*. 103:388-395.
- Jadrich, J.L., B. O'Connor M, and E. Coucouvanis. 2006. The TGF{beta} activated kinase TAK1 regulates vascular development in vivo. *Development*. 133:1529-1541.
- Jeanpierre, S., F.E. Nicolini, B. Kaniewski, C. Dumontet, R. Rimokh, A. Puisieux, and V. Maguer-Satta. 2008. BMP4 regulation of human megakaryocytic differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood*. 112:3154-3163.
- Jiao, K., H. Kulesa, K. Tompkins, Y. Zhou, L. Batts, H.S. Baldwin, and B.L. Hogan. 2003. An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes & development*. 17:2362-2367.
- Jin, W., C. Yun, H.S. Kim, and S.J. Kim. 2007. TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer research*. 67:9869-9877.
- Johnson, D.W., J.N. Berg, M.A. Baldwin, C.J. Gallione, I. Marondel, S.J. Yoon, T.T. Stenzel, M. Speer, M.A. Pericak-Vance, A. Diamond, A.E. Guttmacher, C.E. Jackson, L. Attisano, R. Kucherlapati, M.E. Porteous, and D.A. Marchuk. 1996. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nature genetics*. 13:189-195.
- Joukov, V., K. Pajusola, A. Kaipainen, D. Chilov, I. Lahtinen, E. Kukk, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo. 1996. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal*. 15:1751.
- Juriscic, G., H. Maby-El Hajjami, S. Karaman, A.M. Ochsenbein, A. Alitalo, S.S. Siddiqui, C. Ochoa Pereira, T.V. Petrova, and M. Detmar. 2012. An unexpected role of semaphorin3a-neuropilin-



- 1 signaling in lymphatic vessel maturation and valve formation. *Circulation research*. 111:426-436.
- Kaipainen, A., J. Korhonen, T. Mustonen, V.W. van Hinsbergh, G.H. Fang, D. Dumont, M. Breitman, and K. Alitalo. 1995. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:3566-3570.
- Kajimoto, H., K. Hashimoto, S.N. Bonnet, A. Haromy, G. Harry, R. Moudgil, T. Nakanishi, I. Rebeyka, B. Thebaud, E.D. Michelakis, and S.L. Archer. 2007. Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species: a newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. *Circulation*. 115:1777-1788.
- Kamba, T., B.Y. Tam, H. Hashizume, A. Haskell, B. Sennino, M.R. Mancuso, S.M. Norberg, S.M. O'Brien, R.B. Davis, L.C. Gowen, K.D. Anderson, G. Thurston, S. Joho, M.L. Springer, C.J. Kuo, and D.M. McDonald. 2006. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 290:H560-576.
- Kazenwadel, J., G.A. Secker, Y.J. Liu, J.A. Rosenfeld, R.S. Wildin, J. Cuellar-Rodriguez, A.P. Hsu, S. Dyack, C.V. Fernandez, C.E. Chong, M. Babic, P.G. Bardy, A. Shimamura, M.Y. Zhang, T. Walsh, S.M. Holland, D.D. Hickstein, M.S. Horwitz, C.N. Hahn, H.S. Scott, and N.L. Harvey. 2012. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood*. 119:1283-1291.
- Kendall, R.L., R.Z. Rutledge, X. Mao, A.J. Tebben, R.W. Hungate, and K.A. Thomas. 1999. Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *The Journal of biological chemistry*. 274:6453-6460.
- Kielty, C.M., M.J. Sherratt, and C.A. Shuttleworth. 2002. Elastic fibres. *Journal of cell science*. 115:2817-2828.
- Kim, J.H., M.R. Peacock, S.C. George, and C.C. Hughes. 2012. BMP9 induces EphrinB2 expression in endothelial cells through an Alk1-BMPRII/ActRII-ID1/ID3-dependent pathway: implications for hereditary hemorrhagic telangiectasia type II. *Angiogenesis*. 15:497-509.
- Kim, R.Y., E.J. Robertson, and M.J. Solloway. 2001. Bmp6 and Bmp7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart. *Developmental biology*. 235:449-466.
- Koltowska, K., K.L. Betterman, N.L. Harvey, and B.M. Hogan. 2013. Getting out and about: the emergence and morphogenesis of the vertebrate lymphatic vasculature. *Development*. 140:1857-1870.
- Korchynskiy, O., and P. ten Dijke. 2002. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *The Journal of biological chemistry*. 277:4883-4891.
- Krummel, T.M., B.A. Michna, B.L. Thomas, M.B. Sporn, J.M. Nelson, A.M. Salzberg, I.K. Cohen, and R.F. Diegelmann. 1988. Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces fibrosis in a fetal wound model. *Journal of pediatric surgery*. 23:647-652.
- Kume, T. 2008. Foxc2 transcription factor: a newly described regulator of angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*. 18:224-228.
- Kume, T. 2009. Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *Journal of angiogenesis research*. 1:8.
- Kwei, S., G. Stavrakis, M. Takahas, G. Taylor, M.J. Folkman, M.A. Gimbrone, Jr., and G. Garcia-Cardena. 2004. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *The American journal of pathology*. 164:81-89.

- Lacolley, P., V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li, and J.B. Michel. 2012. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular research*. 95:194-204.
- Lamouille, S., C. Mallet, J.J. Feige, and S. Bailly. 2002. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood*. 100:4495-4501.
- Lan, Y., B. Liu, H. Yao, F. Li, T. Weng, G. Yang, W. Li, X. Cheng, N. Mao, and X. Yang. 2007. Essential role of endothelial Smad4 in vascular remodeling and integrity. *Molecular and cellular biology*. 27:7683-7692.
- Larrivee, B., C. Prahst, E. Gordon, R. Del Toro, T. Mathivet, A. Duarte, M. Simons, and A. Eichmann. 2012. ALK1 Signaling Inhibits Angiogenesis by Cooperating with the Notch Pathway. *Developmental cell*. 22:489-500.
- Larsson, J., M.J. Goumans, L.J. Sjostrand, M.A. van Rooijen, D. Ward, P. Leveen, X. Xu, P. ten Dijke, C.L. Mummery, and S. Karlsson. 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *The EMBO journal*. 20:1663-1673.
- Laux, D.W., S. Young, J.P. Donovan, C.J. Mansfield, P.D. Upton, and B.L. Roman. 2013. Circulating Bmp10 acts through endothelial Alk1 to mediate flow-dependent arterial quiescence. *Development*.
- Lechleider, R.J., J.L. Ryan, L. Garrett, C. Eng, C. Deng, A. Wynshaw-Boris, and A.B. Roberts. 2001. Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Developmental biology*. 240:157-167.
- Lee, H.J., and G.Y. Koh. 2003. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 304:399-404.
- Lee, M.K., C. Pardoux, M.C. Hall, P.S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S.M. Smith, and R. Derynck. 2007. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO journal*. 26:3957-3967.
- Lee, S., J. Kang, J. Yoo, S.K. Ganesan, S.C. Cook, B. Aguilar, S. Ramu, J. Lee, and Y.K. Hong. 2009. Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TFII to specify lymphatic endothelial cell fate. *Blood*. 113:1856-1859.
- Lei, I., X. Gao, M.H. Sham, and Z. Wang. 2012. SWI/SNF protein component BAF250a regulates cardiac progenitor cell differentiation by modulating chromatin accessibility during second heart field development. *The Journal of biological chemistry*. 287:24255-24262.
- Levet, S., D. Ciais, G. Merdzhanova, C. Mallet, T.A. Zimmers, S.J. Lee, F.P. Navarro, I. Texier, J.J. Feige, S. Bailly, and D. Vittet. 2013. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*.
- Li, D.Y., L.K. Sorensen, B.S. Brooke, L.D. Urness, E.C. Davis, D.G. Taylor, B.B. Boak, and D.P. Wendel. 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 284:1534-1537.
- Li, J.Z., H. Li, T. Sasaki, D. Holman, B. Beres, R.J. Dumont, D.D. Pittman, G.R. Hankins, and G.A. Helm. 2003. Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene therapy*. 10:1735-1743.
- Lin, F.J., X. Chen, J. Qin, Y.K. Hong, M.J. Tsai, and S.Y. Tsai. 2010. Direct transcriptional regulation of neuropilin-2 by COUP-TFII modulates multiple steps in murine lymphatic vessel development. *The Journal of clinical investigation*. 120:1694-1707.
- Lin, S., J. Kim, M.J. Lee, L. Roche, N.L. Yang, P.S. Tsao, and S.G. Rockson. 2012. Prospective transcriptomic pathway analysis of human lymphatic vascular insufficiency: identification and validation of a circulating biomarker panel. *PloS one*. 7:e52021.
- Liu, C., P. Xu, S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck. 2009. TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. *Molecular cell*. 35:26-36.
- Liu, D., J. Wang, B. Kinzel, M. Mueller, X. Mao, R. Valdez, Y. Liu, and E. Li. 2007. Dosage-dependent requirement of BMP type II receptor for maintenance of vascular integrity. *Blood*. 110:1502-1510.
- Loeys, B.L., J. Chen, E.R. Neptune, D.P. Judge, M. Podowski, T. Holm, J. Meyers, C.C. Leitch, N. Katsanis, N. Sharifi, F.L. Xu, L.A. Myers, P.J. Spevak, D.E. Cameron, J. De Backer, J. Hellemans,

- Y. Chen, E.C. Davis, C.L. Webb, W. Kress, P. Coucke, D.B. Rifkin, A.M. De Paepe, and H.C. Dietz. 2005. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nature genetics*. 37:275-281.
- Loffredo, F.S., M.L. Steinhauser, S.M. Jay, J. Gannon, J.R. Pancoast, P. Yalamanchi, M. Sinha, C. Dall'Osso, D. Khong, J.L. Shadrach, C.M. Miller, B.S. Singer, A. Stewart, N. Psychogios, R.E. Gerszten, A.J. Hartigan, M.J. Kim, T. Serwold, A.J. Wagers, and R.T. Lee. 2013. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell*. 153:828-839.
- Loftin, C.D., H.F. Tiano, and R. Langenbach. 2002. Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 68-69:177-185.
- Loftin, C.D., D.B. Trivedi, H.F. Tiano, J.A. Clark, C.A. Lee, J.A. Epstein, S.G. Morham, M.D. Breyer, M. Nguyen, B.M. Hawkins, J.L. Goulet, O. Smithies, B.H. Koller, and R. Langenbach. 2001. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:1059-1064.
- Lonn, P., A. Moren, E. Raja, M. Dahl, and A. Moustakas. 2009. Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell research*. 19:21-35.
- Lopez-Coviella, I., B. Berse, R. Krauss, R.S. Thies, and J.K. Blusztajn. 2000. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science*. 289:313-316.
- Lopez-Coviella, I., M.T. Follettie, T.J. Mellott, V.P. Kovacheva, B.E. Slack, V. Diesl, B. Berse, R.S. Thies, and J.K. Blusztajn. 2005. Bone morphogenetic protein 9 induces the transcriptome of basal forebrain cholinergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:6984-6989.
- Lowery, J.W., and M.P. de Caestecker. 2010. BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine & growth factor reviews*. 21:287-298.
- Lutter, S., S. Xie, F. Tatin, and T. Makinen. 2012. Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. *The Journal of cell biology*. 197:837-849.
- Lyden, D., A.Z. Young, D. Zagzag, W. Yan, W. Gerald, R. O'Reilly, B.L. Bader, R.O. Hynes, Y. Zhuang, K. Manova, and R. Benezra. 1999. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*. 401:670-677.
- Ma, G.C., C.S. Liu, S.P. Chang, K.T. Yeh, Y.Y. Ke, T.H. Chen, B.B. Wang, S.J. Kuo, J.C. Shih, and M. Chen. 2008. A recurrent ITGA9 missense mutation in human fetuses with severe chylothorax: possible correlation with poor response to fetal therapy. *Prenatal diagnosis*. 28:1057-1063.
- Maby-El Hajjami, H., and T.V. Petrova. 2008. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochemistry and cell biology*. 130:1063-1078.
- Maguer-Satta, V., L. Bartholin, S. Jeanpierre, M. Ffrench, S. Martel, J.P. Magaud, and R. Rimokh. 2003. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. *Experimental cell research*. 282:110-120.
- Mahlawat, P., U. Ilangoan, T. Biswas, L.Z. Sun, and A.P. Hinck. 2012. Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding properties. *Biochemistry*. 51:6328-6341.
- Mahmoud, M., K.R. Allinson, Z. Zhai, R. Oakenfull, P. Ghandi, R.H. Adams, M. Fruttiger, and H.M. Arthur. 2010. Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circulation research*. 106:1425-1433.
- Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 277:55-60.

- Majesky, M.W. 2007. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 27:1248-1258.
- Makanya, A.N., R. Hlushchuk, and V.G. Djonov. 2009. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis*. 12:113-123.
- Makinen, T., R.H. Adams, J. Bailey, Q. Lu, A. Ziemiecki, K. Alitalo, R. Klein, and G.A. Wilkinson. 2005. PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes & development*. 19:397-410.
- Malloy, L.E., K.K. Wen, A.R. Pierick, E.W. Wedemeyer, S.E. Bergeron, N.D. Vanderpool, M. McKane, P.A. Rubenstein, and H.L. Bartlett. 2012. Thoracic aortic aneurysm (TAAD)-causing mutation in actin affects formin regulation of polymerization. *The Journal of biological chemistry*. 287:28398-28408.
- Margaris, K.N., and R.A. Black. 2012. Modelling the lymphatic system: challenges and opportunities. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 9:601-612.
- Martinez-Corral, I., and T. Makinen. 2013. Regulation of lymphatic vascular morphogenesis: Implications for pathological (tumor) lymphangiogenesis. *Experimental cell research*.
- Mason, C.A., J.L. Bigras, S.B. O'Blenes, B. Zhou, B. McIntyre, N. Nakamura, Y. Kaneda, and M. Rabinovitch. 1999. Gene transfer in utero biologically engineers a patent ductus arteriosus in lambs by arresting fibronectin-dependent neointimal formation. *Nature medicine*. 5:176-182.
- Massague, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67:753-791.
- Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 103:295-309.
- Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes & development*. 19:2783-2810.
- Matsumoto, K., Y. Li, C. Jakuba, Y. Sugiyama, T. Sayo, M. Okuno, C.N. Dealy, B.P. Toole, J. Takeda, Y. Yamaguchi, and R.A. Kosher. 2009. Conditional inactivation of Has2 reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb. *Development*. 136:2825-2835.
- Maxson, J.E., J. Chen, C.A. Enns, and A.S. Zhang. 2010. Matrilysin-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression. *The Journal of biological chemistry*. 285:39021-39028.
- Mazerbourg, S., and A.J. Hsueh. 2006. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update*. 12:373-383.
- Mazerbourg, S., K. Sangkuhl, C.W. Luo, S. Sudo, C. Klein, and A.J. Hsueh. 2005. Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *The Journal of biological chemistry*. 280:32122-32132.
- McAllister, K.A., K.M. Grogg, D.W. Johnson, C.J. Gallione, M.A. Baldwin, C.E. Jackson, E.A. Helmbold, D.S. Markel, W.C. McKinnon, J. Murrell, and et al. 1994. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature genetics*. 8:345-351.
- McLean SE, M.B., Kelleher CM, Mariani TJ, Mecham RP. 2005. matrix gene expression in the developing mouse aorta. *Extracellular Matrices and Development*.
- Mitchell, D., E.G. Pobre, A.W. Mulivor, A.V. Grinberg, R. Castonguay, T.E. Monnell, N. Solban, J.A. Ucran, R.S. Pearsall, K.W. Underwood, J. Seehra, and R. Kumar. 2010. ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol Cancer Ther*. 9:379-388.
- Miyake, T., N.S. Alli, and J.C. McDermott. 2010. Nuclear function of Smad7 promotes myogenesis. *Molecular and cellular biology*. 30:722-735.
- Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & growth factor reviews*. 16:251-263.

- Moorman, A.F., and V.M. Christoffels. 2003. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiological reviews*. 83:1223-1267.
- Morano, I., G.X. Chai, L.G. Baltas, V. Lamounier-Zepter, G. Lutsch, M. Kott, H. Haase, and M. Bader. 2000. Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin. *Nature cell biology*. 2:371-375.
- Moren, A., T. Imamura, K. Miyazono, C.H. Heldin, and A. Moustakas. 2005. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *The Journal of biological chemistry*. 280:22115-22123.
- Moser, M., S. Dahmen, R. Kluge, H. Grone, J. Dahmen, D. Kunz, H. Schorle, and R. Buettner. 2003. Terminal renal failure in mice lacking transcription factor AP-2 beta. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 83:571-578.
- Mouta-Bellum, C., A. Kirov, L. Miceli-Libby, M.L. Mancini, T.V. Petrova, L. Liaw, I. Prudovsky, P.E. Thorpe, N. Miura, L.C. Cantley, K. Alitalo, D.A. Fruman, and C.P. Vary. 2009. Organ-specific lymphangiectasia, arrested lymphatic sprouting, and maturation defects resulting from gene-targeting of the PI3K regulatory isoforms p85alpha, p55alpha, and p50alpha. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 238:2670-2679.
- Mouta Carreira, C., S.M. Nasser, E. di Tomaso, T.P. Padera, Y. Boucher, S.I. Tomarev, and R.K. Jain. 2001. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer research*. 61:8079-8084.
- Moya, I.M., L. Umans, E. Maas, P.N. Pereira, K. Beets, A. Francis, W. Sents, E.J. Robertson, C.L. Mummery, D. Huylebroeck, and A. Zwijsen. 2012. Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades. *Developmental cell*. 22:501-514.
- Moyon, D., L. Pardanaud, L. Yuan, C. Breant, and A. Eichmann. 2001. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development*. 128:3359-3370.
- Mu, Y., R. Sundar, N. Thakur, M. Ekman, S.K. Gudey, M. Yakymovych, A. Hermansson, H. Dimitriou, M.T. Bengoechea-Alonso, J. Ericsson, C.H. Heldin, and M. Landstrom. 2011. TRAF6 ubiquitinates TGFbeta type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer. *Nature communications*. 2:330.
- Muthuchamy, M., and D. Zawieja. 2008. Molecular regulation of lymphatic contractility. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1131:89-99.
- Nagashima, T., Q. Li, C. Clementi, J.P. Lydon, F.J. DeMayo, and M.M. Matzuk. 2013. BMPR2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance. *The Journal of clinical investigation*. 123:2539-2550.
- Neuhaus, H., V. Rosen, and R.S. Thies. 1999. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mechanisms of development*. 80:181-184.
- Nguyen, M., T. Camenisch, J.N. Snouwaert, E. Hicks, T.M. Coffman, P.A. Anderson, N.N. Malouf, and B.H. Koller. 1997. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature*. 390:78-81.
- Nichols, J.T., A. Miyamoto, S.L. Olsen, B. D'Souza, C. Yao, and G. Weinmaster. 2007. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *The Journal of cell biology*. 176:445-458.
- Niessen, K., G. Zhang, J.B. Ridgway, H. Chen, G. Kolumam, C.W. Siebel, and M. Yan. 2011. The Notch1-Dll4 signaling pathway regulates mouse postnatal lymphatic development. *Blood*. 118:1989-1997.
- Niessen, K., G. Zhang, J.B. Ridgway, H. Chen, and M. Yan. 2010. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood*. 115:1654-1661.
- Nishita, M., N. Ueno, and H. Shibuya. 1999. Smad8B, a Smad8 splice variant lacking the SSXS site that inhibits Smad8-mediated signalling. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 4:583-591.
- Nomura, T., R. Lu, M.L. Pucci, and V.L. Schuster. 2004. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Molecular pharmacology*. 65:973-978.

- Norrmén, C., K.I. Ivanov, J. Cheng, N. Zangger, M. Delorenzi, M. Jaquet, N. Miura, P. Puolakkainen, V. Horsley, J. Hu, H.G. Augustin, S. Yla-Herttuala, K. Alitalo, and T.V. Petrova. 2009. FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. *The Journal of cell biology*. 185:439-457.
- Oh, S.P., and E. Li. 1997. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes & development*. 11:1812-1826.
- Oh, S.P., T. Seki, K.A. Goss, T. Imamura, Y. Yi, P.K. Donahoe, L. Li, K. Miyazono, P. ten Dijke, S. Kim, and E. Li. 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$  1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:2626-2631.
- Oliver, G., B. Sosa-Pineda, S. Geisendorff, E.P. Spana, C.Q. Doe, and P. Gruss. 1993. Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mechanisms of development*. 44:3-16.
- Onichtchouk, D., Y.G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Delius, J. Massague, and C. Niehrs. 1999. Silencing of TGF- $\beta$  signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*. 401:480-485.
- Oreffo, R.O., G.R. Mundy, S.M. Seyedin, and L.F. Bonewald. 1989. Activation of the bone-derived latent TGF  $\beta$  complex by isolated osteoclasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 158:817-823.
- Osada, M., O. Inoue, G. Ding, T. Shirai, H. Ichise, K. Hirayama, K. Takano, Y. Yatomi, M. Hirashima, H. Fujii, K. Suzuki-Inoue, and Y. Ozaki. 2012. Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 287:22241-22252.
- Oshima, M., H. Oshima, and M.M. Taketo. 1996. TGF- $\beta$  receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Developmental biology*. 179:297-302.
- Park, C., K. Lavine, Y. Mishina, C.X. Deng, D.M. Ornitz, and K. Choi. 2006. Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation. *Development*. 133:3473-3484.
- Park, S.O., Y.J. Lee, T. Seki, K.H. Hong, N. Fliess, Z. Jiang, A. Park, X. Wu, V. Kaartinen, B.L. Roman, and S.P. Oh. 2008. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood*. 111:633-642.
- Park, S.O., M. Wankhede, Y.J. Lee, E.J. Choi, N. Fliess, S.W. Choe, S.H. Oh, G. Walter, M.K. Raizada, B.S. Sorg, and S.P. Oh. 2009. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The Journal of clinical investigation*. 119:3487-3496.
- Patel-Hett, S., and P.A. D'Amore. 2011. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International journal of developmental biology*. 55:353-363.
- Petrova, T.V., T. Karpanen, C. Norrmén, R. Mellor, T. Tamakoshi, D. Finegold, R. Ferrell, D. Kerjaschki, P. Mortimer, S. Yla-Herttuala, N. Miura, and K. Alitalo. 2004. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nature medicine*. 10:974-981.
- Petrova, T.V., T. Makinen, T.P. Makela, J. Saarela, I. Virtanen, R.E. Ferrell, D.N. Finegold, D. Kerjaschki, S. Yla-Herttuala, and K. Alitalo. 2002. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *The EMBO journal*. 21:4593-4599.
- Pham, T.H., P. Baluk, Y. Xu, I. Grigorova, A.J. Bankovich, R. Pappu, S.R. Coughlin, D.M. McDonald, S.R. Schwab, and J.G. Cyster. 2010. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *The Journal of experimental medicine*. 207:17-27.
- Plauchu, H., J.P. de Chadarevian, A. Bideau, and J.M. Robert. 1989. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet*. 32:291-297.

- Porrello, E.R. 2013. microRNAs in cardiac development and regeneration. *Clinical science*. 125:151-166.
- Pugsley, M.K., and R. Tabrizchi. 2000. The vascular system. An overview of structure and function. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 44:333-340.
- Rabinovitch, M. 1996. Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. *Seminars in perinatology*. 20:531-541.
- Raica, M., A.M. Cimpean, and D. Ribatti. 2008. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer research*. 28:2997-3006.
- Rana, S., A.S. Cerdeira, J. Wenger, S. Salahuddin, K.H. Lim, S.J. Ralston, R.I. Thadhani, and S.A. Karumanchi. 2012. Plasma concentrations of soluble endoglin versus standard evaluation in patients with suspected preeclampsia. *PloS one*. 7:e48259.
- Redman, C.W. 1997. Cytotrophoblasts: masters of disguise. *Nature medicine*. 3:610-611.
- Ricard, N., D. Ciais, S. Levet, M. Subileau, C. Mallet, T.A. Zimmers, S.J. Lee, M. Bidart, J.J. Feige, and S. Bailly. 2012. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*. 119:6162-6171.
- Roberts, A.B., and M.B. Sporn. 1989. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. *Am Rev Respir Dis*. 140:1126-1128.
- Roberts, H.J., S. Hu, Q. Qiu, P.C. Leung, I. Caniggia, A. Gruslin, B. Tsang, and C. Peng. 2003. Identification of novel isoforms of activin receptor-like kinase 7 (ALK7) generated by alternative splicing and expression of ALK7 and its ligand, Nodal, in human placenta. *Biology of reproduction*. 68:1719-1726.
- Roizen, J.D., M. Asada, M. Tong, H.H. Tai, and L.J. Muglia. 2008. Preterm birth without progesterone withdrawal in 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase hypomorphic mice. *Molecular endocrinology*. 22:105-112.
- Roman, B.L., V.N. Pham, N.D. Lawson, M. Kulik, S. Childs, A.C. Lekven, D.M. Garrity, R.T. Moon, M.C. Fishman, R.J. Lechleider, and B.M. Weinstein. 2002. Disruption of *acvrl1* increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels. *Development*. 129:3009-3019.
- Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz, and D.T. Shima. 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & development*. 16:2684-2698.
- Sabine, A., Y. Agalarov, H. Maby-El Hajjami, M. Jaquet, R. Hagerling, C. Pollmann, D. Bebbler, A. Pfenniger, N. Miura, O. Dormond, J.M. Calmes, R.H. Adams, T. Makinen, F. Kiefer, B.R. Kwak, and T.V. Petrova. 2012. Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. *Developmental cell*. 22:430-445.
- Sallmon, H., S.C. Weber, B. Huning, A. Stein, P.A. Horn, B.C. Metze, C. Dame, C. Buhrer, U. Felderhoff-Muser, G. Hansmann, and P. Koehne. 2012. Thrombocytopenia in the first 24 hours after birth and incidence of patent ductus arteriosus. *Pediatrics*. 130:e623-630.
- Salven, P., S. Mustjoki, R. Alitalo, K. Alitalo, and S. Rafii. 2003. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*. 101:168-172.
- Samavarchi-Tehrani, P., A. Golipour, L. David, H.K. Sung, T.A. Beyer, A. Datti, K. Woltjen, A. Nagy, and J.L. Wrana. 2010. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell stem cell*. 7:64-77.
- Sammar, M., S. Stricker, G.C. Schwabe, C. Sieber, A. Hartung, M. Hanke, I. Oishi, J. Pohl, Y. Minami, W. Sebald, S. Mundlos, and P. Knaus. 2004. Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 9:1227-1238.
- Sasaki, T., R. Fassler, and E. Hohenester. 2004. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *The Journal of cell biology*. 164:959-963.
- Satoda, M., F. Zhao, G.A. Diaz, J. Burn, J. Goodship, H.R. Davidson, M.E. Pierpont, and B.D. Gelb. 2000. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nature genetics*. 25:42-46.



- Satow, R., A. Kurisaki, T.C. Chan, T.S. Hamazaki, and M. Asashima. 2006. Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction. *Developmental cell*. 11:763-774.
- Sawane, M., K. Kajiya, H. Kidoya, M. Takagi, F. Muramatsu, and N. Takakura. 2013. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes*. 62:1970-1980.
- Scharpfenecker, M., M. van Dinther, Z. Liu, R.L. van Bezooijen, Q. Zhao, L. Pukac, C.W. Lowik, and P. ten Dijke. 2007. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of cell science*. 120:964-972.
- Schnerer, O., S.K. Meurer, L. Tihaa, A.M. Gressner, and R. Weiskirchen. 2007. Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 282:13934-13943.
- Schneider, A., Y. Guan, Y. Zhang, M.A. Magnuson, C. Pettepher, C.D. Loftin, R. Langenbach, R.M. Breyer, and M.D. Breyer. 2004. Generation of a conditional allele of the mouse prostaglandin EP4 receptor. *Genesis*. 40:7-14.
- Schneider, D.J. 2012. The patent ductus arteriosus in term infants, children, and adults. *Seminars in perinatology*. 36:146-153.
- Schnitzler, A.C., T.J. Mellott, I. Lopez-Coviella, Y.N. Tallini, M.I. Kotlikoff, M.T. Follettie, and J.K. Blusztajn. 2010. BMP9 (bone morphogenetic protein 9) induces NGF as an autocrine/paracrine cholinergic trophic factor in developing basal forebrain neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:8221-8228.
- Schulte-Merker, S., A. Sabine, and T.V. Petrova. 2011. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *The Journal of cell biology*. 193:607-618.
- Schultz-Cherry, S., and V.S. Hinshaw. 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *Journal of virology*. 70:8624-8629.
- Schultz-Cherry, S., S. Ribeiro, L. Gentry, and J.E. Murphy-Ullrich. 1994. Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *The Journal of biological chemistry*. 269:26775-26782.
- Seemann, P., A. Brehm, J. Konig, C. Reissner, S. Stricker, P. Kuss, J. Haupt, S. Renninger, J. Nickel, W. Sebald, J.C. Groppe, F. Ploger, J. Pohl, M. Schmidt-von Kegler, M. Walther, I. Gassner, C. Rusu, A.R. Janecke, K. Dathe, and S. Mundlos. 2009. Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS genetics*. 5:e1000747.
- Segi, E., Y. Sugimoto, A. Yamasaki, Y. Aze, H. Oida, T. Nishimura, T. Murata, T. Matsuoka, F. Ushikubi, M. Hirose, T. Tanaka, N. Yoshida, S. Narumiya, and A. Ichikawa. 1998. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 246:7-12.
- Seidah, N.G., G. Mayer, A. Zaid, E. Rousselet, N. Nassoury, S. Poirier, R. Essalmani, and A. Prat. 2008. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 40:1111-1125.
- Sengle, G., N.L. Charbonneau, R.N. Ono, T. Sasaki, J. Alvarez, D.R. Keene, H.P. Bachinger, and L.Y. Sakai. 2008. Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *The Journal of biological chemistry*. 283:13874-13888.
- Sengle, G., R.N. Ono, T. Sasaki, and L.Y. Sakai. 2011. Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *The Journal of biological chemistry*. 286:5087-5099.
- Shah, N.A., N.K. Hills, N. Waleh, D. McCurnin, S. Seidner, S. Chemtob, and R. Clyman. 2011. Relationship between circulating platelet counts and ductus arteriosus patency after indomethacin treatment. *The Journal of pediatrics*. 158:919-923 e911-912.
- Sharpe, G.L., B. Thalme, and K.S. Larsson. 1974. Studies on closure of the ductus arteriosus. XI. Ductal closure in utero by a prostaglandin synthetase inhibitor. *Prostaglandins*. 8:363-368.
- Shen, D., J. Li, J.J. Lepore, T.J. Anderson, S. Sinha, A.Y. Lin, L. Cheng, E.D. Cohen, J.D. Roberts, Jr., S. Dedhar, M.S. Parmacek, and R.E. Gerszten. 2011. Aortic aneurysm generation in mice with

- targeted deletion of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 109:616-628.
- Shi, M., J. Zhu, R. Wang, X. Chen, L. Mi, T. Walz, and T.A. Springer. 2011. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature*. 474:343-349.
- Shovlin, C.L., A.E. Guttmacher, E. Buscarini, M.E. Faughnan, R.H. Hyland, C.J. Westermann, A.D. Kjeldsen, and H. Plauchu. 2000. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu- Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet*. 91:66-67.
- Sieber, C., J. Kopf, C. Hiepen, and P. Knaus. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & growth factor reviews*. 20:343-355.
- Singhatanadgit, W., V. Salih, and I. Olsen. 2006. Shedding of a soluble form of BMP receptor-IB controls bone cell responses to BMP. *Bone*. 39:1008-1017.
- Slomp, J., J.C. van Munsteren, R.E. Poelmann, E.G. de Reeder, A.J. Bogers, and A.C. Gittenberger-de Groot. 1992. Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Atherosclerosis*. 93:25-39.
- Smith, G.C. 1998. The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacological reviews*. 50:35-58.
- Smith, G.C., R.A. Coleman, and J.C. McGrath. 1994. Characterization of dilator prostanoid receptors in the fetal rabbit ductus arteriosus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 271:390-396.
- Smith, G.C., and J.C. McGrath. 1995. Contractile effects of prostanoids on fetal rabbit ductus arteriosus. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 25:113-118.
- Solloway, M.J., and E.J. Robertson. 1999. Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development*. 126:1753-1768.
- Song, L., W. Yan, X. Chen, C.X. Deng, Q. Wang, and K. Jiao. 2007. Myocardial smad4 is essential for cardiogenesis in mouse embryos. *Circulation research*. 101:277-285.
- Souchelnytskyi, S., K. Tamaki, U. Engstrom, C. Wernstedt, P. ten Dijke, and C.H. Heldin. 1997. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry*. 272:28107-28115.
- Souza, T.A., X. Chen, Y. Guo, P. Sava, J. Zhang, J.J. Hill, P.J. Yaworsky, and Y. Qiu. 2008. Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators. *Molecular endocrinology*. 22:2689-2702.
- Srinivasan, R.S., X. Geng, Y. Yang, Y. Wang, S. Mukatira, M. Studer, M.P. Porto, O. Lagutin, and G. Oliver. 2010. The nuclear hormone receptor Coup-TFII is required for the initiation and early maintenance of Prox1 expression in lymphatic endothelial cells. *Genes & development*. 24:696-707.
- Stoller, J.Z., S.B. Dem Mauro, J.M. Dagle, and J. Reese. 2012. Current Perspectives on Pathobiology of the Ductus Arteriosus. *J Clin Exp Cardiol*. 8.
- Sui, X., D. Li, H. Qiu, V. Gaussin, and C. DePre. 2009. Activation of the bone morphogenetic protein receptor by H11kinase/Hsp22 promotes cardiac cell growth and survival. *Circulation research*. 104:887-895.
- Susan-Resiga, D., R. Essalmani, J. Hamelin, M.C. Asselin, S. Benjannet, A. Chamberland, R. Day, D. Szumska, D. Constam, S. Bhattacharya, A. Prat, and N.G. Seidah. 2011. Furin is the major processing enzyme of the cardiac-specific growth factor bone morphogenetic protein 10. *The Journal of biological chemistry*. 286:22785-22794.
- Suzuki, Y., N. Ohga, Y. Morishita, K. Hida, K. Miyazono, and T. Watabe. 2010. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *Journal of cell science*. 123:1684-1692.
- Tada, T., and H. Kishimoto. 1990. Ultrastructural and histological studies on closure of the mouse ductus arteriosus. *Acta Anatomica*. 139:326-334.

- Taipale, J., T. Makinen, E. Arighi, E. Kukk, M. Karkkainen, and K. Alitalo. 1999. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Current topics in microbiology and immunology*. 237:85-96.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida, and M. Shibuya. 2001. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal*. 20:2768-2778.
- Takashima, S., M. Kitakaze, M. Asakura, H. Asanuma, S. Sanada, F. Tashiro, H. Niwa, J. Miyazaki Ji, S. Hirota, Y. Kitamura, T. Kitsukawa, H. Fujisawa, M. Klagsbrun, and M. Hori. 2002. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:3657-3662.
- Takizawa, T., T. Oda, K. Arishima, M. Yamamoto, H. Somiya, Y. Eguchi, and K. Shiota. 1994. Inhibitory effect of enalapril on the constriction of the ductus arteriosus in newborn rats. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 56:605-606.
- Tammela, T., and K. Alitalo. 2010. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*. 140:460-476.
- Tammela, T., G. Zarkada, E. Wallgard, A. Murtomaki, S. Suchting, M. Wirzenius, M. Waltari, M. Hellstrom, T. Schomber, R. Peltonen, C. Freitas, A. Duarte, H. Isoniemi, P. Laakkonen, G. Christofori, S. Yla-Herttuala, M. Shibuya, B. Pytowski, A. Eichmann, C. Betsholtz, and K. Alitalo. 2008. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 454:656-660.
- Tananari, Y., Y. Maeno, T. Takagishi, Y. Sasaguri, M. Morimatsu, and H. Kato. 2000. Role of apoptosis in the closure of neonatal ductus arteriosus. *Japanese circulation journal*. 64:684-688.
- Tannenbaum, J.E., N.S. Waleh, F. Mauray, J. Breuss, R. Pytela, R.H. Kramer, and R.I. Clyman. 1995. Transforming growth factor beta 1 inhibits fetal lamb ductus arteriosus smooth muscle cell migration. *Pediatric research*. 37:561-570.
- Tannenbaum, J.E., N.S. Waleh, F. Mauray, L. Gold, E.A. Perket, and R.I. Clyman. 1996. Transforming growth factor-beta protein and messenger RNA expression is increased in the closing ductus arteriosus. *Pediatric research*. 39:427-434.
- Tatin, F., A. Taddei, A. Weston, E. Fuchs, D. Devenport, F. Tissir, and T. Makinen. 2013. Planar Cell Polarity Protein Celsr1 Regulates Endothelial Adherens Junctions and Directed Cell Rearrangements during Valve Morphogenesis. *Developmental cell*. 26:31-44.
- ten Dijke, P., and C.S. Hill. 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends in biochemical sciences*. 29:265-273.
- Terman, B.I., M. Dougher-Vermazen, M.E. Carrion, D. Dimitrov, D.C. Armellino, D. Gospodarowicz, and P. Bohlen. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and biophysical research communications*. 187:1579-1586.
- Terragno, N.A., A. Terragno, J.C. McGiff, and D.J. Rodriguez. 1977. Synthesis of prostaglandins by the ductus arteriosus of the bovine fetus. *Prostaglandins*. 14:721-727.
- Tessari, A., M. Pietrobon, A. Notte, G. Cifelli, P.J. Gage, M.D. Schneider, G. Lembo, and M. Campione. 2008. Myocardial Pitx2 differentially regulates the left atrial identity and ventricular asymmetric remodeling programs. *Circulation research*. 102:813-822.
- Thomas, R.L., G.C. Parker, B. Van Overmeire, and J.V. Aranda. 2005. A meta-analysis of ibuprofen versus indomethacin for closure of patent ductus arteriosus. *European journal of pediatrics*. 164:135-140.
- Thurston, G., J.S. Rudge, E. Ioffe, H. Zhou, L. Ross, S.D. Croll, N. Glazer, J. Holash, D.M. McDonald, and G.D. Yancopoulos. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature medicine*. 6:460-463.
- Townson, S.A., E. Martinez-Hackert, C. Greppi, P. Lowden, D. Sako, J. Liu, J.A. Ucran, K. Liharska, K.W. Underwood, J. Seehra, R. Kumar, and A.V. Grinberg. 2012. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *The Journal of biological chemistry*. 287:27313-27325.

- Trivedi, D.B., Y. Sugimoto, and C.D. Loftin. 2006. Attenuated cyclooxygenase-2 expression contributes to patent ductus arteriosus in preterm mice. *Pediatric research*. 60:669-674.
- Truksa, J., H. Peng, P. Lee, and E. Beutler. 2006. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:10289-10293.
- Umans, L., L. Cox, M. Tjwa, V. Bito, L. Vermeire, K. Laperre, K. Sipido, L. Moons, D. Huylebroeck, and A. Zwijsen. 2007. Inactivation of Smad5 in endothelial cells and smooth muscle cells demonstrates that Smad5 is required for cardiac homeostasis. *The American journal of pathology*. 170:1460-1472.
- Umulis, D., M.B. O'Connor, and S.S. Blair. 2009. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development*. 136:3715-3728.
- Upton, P.D., R.J. Davies, R.C. Trembath, and N.W. Morrell. 2009. BMP and activin type-II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*.
- Urness, L.D., L.K. Sorensen, and D.Y. Li. 2000. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1 [In Process Citation]. *Nature genetics*. 26:328-331.
- Van Overmeire, B., K. Smets, D. Lecoutere, H. Van de Broek, J. Weyler, K. Degroote, and J.P. Langhendries. 2000. A comparison of ibuprofen and indomethacin for closure of patent ductus arteriosus. *The New England journal of medicine*. 343:674-681.
- Velasco-Loyden, G., J. Arribas, and F. Lopez-Casillas. 2004. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *The Journal of biological chemistry*. 279:7721-7733.
- Venkatesha, S., M. Toporsian, C. Lam, J. Hanai, T. Mammoto, Y.M. Kim, Y. Bdolah, K.H. Lim, H.T. Yuan, T.A. Libermann, I.E. Stillman, D. Roberts, P.A. D'Amore, F.H. Epstein, F.W. Sellke, R. Romero, V.P. Sukhatme, M. Letarte, and S.A. Karumanchi. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine*. 12:642-649.
- Vitt, U.A., S.Y. Hsu, and A.J. Hsueh. 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Molecular endocrinology*. 15:681-694.
- Wagenseil, J.E., and R.P. Mecham. 2009. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological reviews*. 89:957-989.
- Wang, J., S. Sridurongrit, M. Dudas, P. Thomas, A. Nagy, M.D. Schneider, J.A. Epstein, and V. Kaartinen. 2005. Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart. *Developmental biology*. 286:299-310.
- Watabe, T., and K. Miyazono. 2009. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell research*. 19:103-115.
- Wigle, J.T., and G. Oliver. 1999. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*. 98:769-778.
- Wiig, H., and M.A. Swartz. 2012. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiological reviews*. 92:1005-1060.
- Winnier, G., M. Blessing, P.A. Labosky, and B.L. Hogan. 1995. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & development*. 9:2105-2116.
- Winnier, G.E., T. Kume, K. Deng, R. Rogers, J. Bundy, C. Raines, M.A. Walter, B.L. Hogan, and S.J. Conway. 1999. Roles for the winged helix transcription factors MF1 and MFH1 in cardiovascular development revealed by nonallelic noncomplementation of null alleles. *Developmental biology*. 213:418-431.
- Wirzenius, M., T. Tammela, M. Uutela, Y. He, T. Odorisio, G. Zambruno, J.A. Nagy, H.F. Dvorak, S. Yla-Herttuala, M. Shibuya, and K. Alitalo. 2007. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *The Journal of experimental medicine*. 204:1431-1440.

- Wu, G.R., S. Jing, K. Momma, and T. Nakanishi. 2001. The effect of vitamin A on contraction of the ductus arteriosus in fetal rat. *Pediatric research*. 49:747-754.
- Xu, Y., L. Yuan, J. Mak, L. Pardanaud, M. Caunt, I. Kasman, B. Larrivee, R. Del Toro, S. Suchting, A. Medvinsky, J. Silva, J. Yang, J.L. Thomas, A.W. Koch, K. Alitalo, A. Eichmann, and A. Bagri. 2010. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *The Journal of cell biology*. 188:115-130.
- Yamazaki, T., Y. Yoshimatsu, Y. Morishita, K. Miyazono, and T. Watabe. 2009. COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 14:425-434.
- Yan, Y., P. Gong, W. Jin, J. Xu, X. Wu, T. Xu, Q. Hang, H. Fu, K. Kei, and Y. Gao. 2012. The cell-specific upregulation of bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) in a model of rat cortical brain injury. *Journal of molecular histology*. 43:543-552.
- Yang, J., S. Bucker, B. Jungblut, T. Bottger, Y. Cinnamon, J. Tchorz, M. Muller, B. Bettler, R. Harvey, Q.Y. Sun, A. Schneider, and T. Braun. 2012. Inhibition of Notch2 by Numb/Numbl like controls myocardial compaction in the heart. *Cardiovascular research*. 96:276-285.
- Yang, X., L.H. Castilla, X. Xu, C. Li, J. Gotay, M. Weinstein, P.P. Liu, and C.X. Deng. 1999. Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*. 126:1571-1580.
- Yao, L.C., P. Baluk, R.S. Srinivasan, G. Oliver, and D.M. McDonald. 2012a. Plasticity of button-like junctions in the endothelium of airway lymphatics in development and inflammation. *The American journal of pathology*. 180:2561-2575.
- Yao, Y., M. Jumabay, A. Ly, M. Radparvar, A.H. Wang, R. Abdmaulen, and K.I. Bostrom. 2012b. Crossveinless 2 regulates bone morphogenetic protein 9 in human and mouse vascular endothelium. *Blood*. 119:5037-5047.
- Ye, L., S. Bokobza, J. Li, M. Moazzam, J. Chen, R.E. Mansel, and W.G. Jiang. 2010. Bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) inhibits aggressiveness of breast cancer cells and correlates with poor prognosis in breast cancer. *Cancer science*. 101:2137-2144.
- Ye, L., H. Kynaston, and W.G. Jiang. 2009. Bone morphogenetic protein-10 suppresses the growth and aggressiveness of prostate cancer cells through a Smad independent pathway. *The Journal of urology*. 181:2749-2759.
- Ying, Q.L., J. Nichols, I. Chambers, and A. Smith. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 115:281-292.
- Yokota, T., T. Aida, Y. Ichikawa, T. Fujita, U. Yokoyama, and S. Minamisawa. 2012. Low-dose thromboxane A2 receptor stimulation promotes closure of the rat ductus arteriosus with minimal adverse effects. *Pediatric research*. 72:129-136.
- Yokoyama, U., S. Minamisawa, and Y. Ishikawa. 2010a. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *Journal of Smooth Muscle Research*. 46:77-87.
- Yokoyama, U., S. Minamisawa, A. Katayama, T. Tang, S. Suzuki, K. Iwatsubo, S. Iwasaki, R. Kurotani, S. Okumura, M. Sato, S. Yokota, H.K. Hammond, and Y. Ishikawa. 2010b. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circulation research*. 106:1882-1892.
- Yokoyama, U., S. Minamisawa, H. Quan, T. Akaike, S. Suzuki, M. Jin, Q. Jiao, M. Watanabe, K. Otsu, S. Iwasaki, S. Nishimaki, M. Sato, and Y. Ishikawa. 2008. Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. *The Journal of biological chemistry*. 283:28702-28709.
- Yokoyama, U., S. Minamisawa, H. Quan, S. Ghatak, T. Akaike, E. Segi-Nishida, S. Iwasaki, M. Iwamoto, S. Misra, K. Tamura, H. Hori, S. Yokota, B.P. Toole, Y. Sugimoto, and Y. Ishikawa. 2006. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *The Journal of clinical investigation*. 116:3026-3034.
- Yoshida, T., and G.K. Owens. 2005. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circulation research*. 96:280-291.

- Yoshimatsu, Y., T. Yamazaki, H. Mihira, T. Itoh, J. Suehiro, K. Yuki, K. Harada, M. Morikawa, C. Iwata, T. Minami, Y. Morishita, T. Kodama, K. Miyazono, and T. Watabe. 2011. Ets family members induce lymphangiogenesis through physical and functional interaction with Prox1. *Journal of cell science*. 124:2753-2762.
- You, L.R., F.J. Lin, C.T. Lee, F.J. DeMayo, M.J. Tsai, and S.Y. Tsai. 2005. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*. 435:98-104.
- Yu, Y., J. Fan, X.S. Chen, D. Wang, A.J. Klein-Szanto, R.L. Campbell, G.A. FitzGerald, and C.D. Funk. 2006. Genetic model of selective COX2 inhibition reveals novel heterodimer signaling. *Nature medicine*. 12:699-704.
- Yuan, L., D. Moyon, L. Pardanaud, C. Breant, M.J. Karkkainen, K. Alitalo, and A. Eichmann. 2002. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*. 129:4797-4806.
- Zamani, N., and C.W. Brown. 2011. Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocrine reviews*. 32:387-403.
- Zawieja, D.C., K.L. Davis, R. Schuster, W.M. Hinds, and H.J. Granger. 1993. Distribution, propagation, and coordination of contractile activity in lymphatics. *The American journal of physiology*. 264:H1283-1291.
- Zraggen, S., A.M. Ochsenbein, and M. Detmar. 2013. An important role of blood and lymphatic vessels in inflammation and allergy. *Journal of allergy*. 2013:672381.
- Zhang, H., and A. Bradley. 1996. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. 122:2977-2986.
- Zhang, M., M. Chen, J.R. Kim, J. Zhou, R.E. Jones, J.D. Tune, G.S. Kassab, D. Metzger, S. Ahlfeld, S.J. Conway, and B.P. Herring. 2011a. SWI/SNF complexes containing Brahma or Brahma-related gene 1 play distinct roles in smooth muscle development. *Molecular and cellular biology*. 31:2618-2631.
- Zhang, N., L. Ye, L. Wu, X. Deng, Y. Yang, and W.G. Jiang. 2013a. Expression of bone morphogenetic protein-10 (BMP10) in human urothelial cancer of the bladder and its effects on the aggressiveness of bladder cancer cells in vitro. *Anticancer research*. 33:1917-1925.
- Zhang, W., H. Chen, Y. Wang, W. Yong, W. Zhu, Y. Liu, G.R. Wagner, R.M. Payne, L.J. Field, H. Xin, C.L. Cai, and W. Shou. 2011b. Tbx20 transcription factor is a downstream mediator for bone morphogenetic protein-10 in regulating cardiac ventricular wall development and function. *The Journal of biological chemistry*. 286:36820-36829.
- Zhang, W., B. Tang, Q. Huang, and Z. Hua. 2013b. Galangin inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma. *Journal of cellular biochemistry*. 114:152-161.
- Zhang, Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell research*. 19:128-139.
- Zhao, F., A.K. Bosserhoff, R. Buettner, and M. Moser. 2011. A heart-hand syndrome gene: Tfp2b plays a critical role in the development and remodeling of mouse ductus arteriosus and limb patterning. *PloS one*. 6:e22908.
- Zhao, F., C.G. Weismann, M. Satoda, M.E. Pierpont, E. Sweeney, E.M. Thompson, and B.D. Gelb. 2001. Novel TFAP2B mutations that cause Char syndrome provide a genotype-phenotype correlation. *American journal of human genetics*. 69:695-703.
- Zhao, N., A.S. Zhang, and C.A. Enns. 2013. Iron regulation by hepcidin. *The Journal of clinical investigation*. 123:2337-2343.
- Zhou, F., Z. Chang, L. Zhang, Y.K. Hong, B. Shen, B. Wang, F. Zhang, G. Lu, D. Tvorogov, K. Alitalo, B.A. Hemmings, Z. Yang, and Y. He. 2010. Akt/Protein kinase B is required for lymphatic network formation, remodeling, and valve development. *The American journal of pathology*. 177:2124-2133.
- Zhu, L., R. Vranckx, P. Khau Van Kien, A. Lalande, N. Boisset, F. Mathieu, M. Wegman, L. Glancy, J.M. Gasc, F. Brunotte, P. Bruneval, J.E. Wolf, J.B. Michel, and X. Jeunemaitre. 2006. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nature genetics*. 38:343-349.

## Annexe

---

**Article:** « BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain ».

Cet article, dont je suis co-auteur, a été publié en 2012 dans *Cellular and molecular life sciences* (Bidart et al., 2012). Marie Bidart, la doctorante qui m'a précédée dans l'équipe en est le premier auteur. J'ai participé à la partie *in vivo*, et aux expériences de chromatographie d'exclusion stérique et d'activation par la furine.



# BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain

Marie Bidart · Nicolas Ricard · Sandrine Levet · Michel Samson ·  
Christine Mallet · Laurent David · Mariela Subileau · Emmanuelle Tillet ·  
Jean-Jacques Feige · Sabine Bailly

Received: 2 March 2011 / Revised: 31 May 2011 / Accepted: 7 June 2011 / Published online: 28 June 2011  
© Springer Basel AG 2011

**Abstract** Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9) has been recently found to be the physiological ligand for the activin receptor-like kinase 1 (ALK1), and to be a major circulating vascular quiescence factor. Moreover, a soluble chimeric ALK1 protein (ALK1-Fc) has recently been developed and showed powerful anti-tumor growth and anti-angiogenic effects. However, not much is known concerning BMP9. This prompted us to investigate the

human endogenous sources of this cytokine and to further characterize its circulating form(s) and its function. Analysis of BMP9 expression reveals that BMP9 is produced by hepatocytes and intrahepatic biliary epithelial cells. Gel filtration analysis combined with ELISA and biological assays demonstrate that BMP9 circulates in plasma (1) as an unprocessed inactive form that can be further activated by furin a serine endoprotease, and (2) as a mature and fully active form (composed of the mature form associated with its prodomain). Analysis of BMP9 circulating levels during mouse development demonstrates that BMP9 peaks during the first 3 weeks after birth and then decreases to 2 ng/mL in adulthood. We also show that circulating BMP9 physiologically induces a constitutive Smad1/5/8 phosphorylation in endothelial cells. Taken together, our results argue for the role of BMP9 as a hepatocyte-derived factor, circulating in inactive (40%) and active (60%) forms, the latter constantly activating endothelial cells to maintain them in a resting state.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00018-011-0751-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Bidart · N. Ricard · S. Levet · C. Mallet · L. David ·  
M. Subileau · E. Tillet · J.-J. Feige · S. Bailly (✉)  
Unit 1036, Biology of Cancer and Infection, INSERM,  
17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France  
e-mail: sbailly@cea.fr

M. Bidart · N. Ricard · S. Levet · C. Mallet · L. David ·  
M. Subileau · E. Tillet · J.-J. Feige · S. Bailly  
UJF-Grenoble 1, Biology of Cancer and Infection,  
38041 Grenoble, France

M. Bidart · N. Ricard · S. Levet · C. Mallet · L. David ·  
M. Subileau · E. Tillet · J.-J. Feige · S. Bailly  
CEA, DSV/iRTSV, Biology of Cancer and Infection,  
38054 Grenoble, France

M. Bidart  
Pôle Recherche, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble,  
38043 Grenoble, France

M. Samson  
U620/EA 4427 SeRAIC, INSERM, Université Rennes 1,  
35043 Rennes, France

L. David  
Center for Systems Biology, Samuel Lunenfeld Research  
Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON M5G 1X5, Canada

**Keywords** BMP9 · Liver · Blood · Hepatocytes ·  
ALK1 · Endothelial cells

## Introduction

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are members of the TGF- $\beta$  superfamily that were originally characterized by their ability to induce endochondral bone formation. There are at least 20 BMP family members, which are involved in numerous biological processes during embryonic development and adult life. These include pluripotency of embryonic stem cells, dorsoventral patterning of the mesoderm, osteoblastic differentiation, bone homeostasis and, more recently, angiogenesis [12, 23, 40].

BMPs are synthesized as large precursors of about 400–500 amino acids consisting of an N-terminal signal peptide directing secretion, a prodomain for proper folding, and a C-terminal mature peptide [4]. Carboxyterminal mature proteins are known to be proteolytically cleaved upon dimerization from the prodomain at an Arg-X-X-Arg sequence by serine endoproteases (in the case of BMP4 by furin, PC6 and PC7) [27]. Following cleavage, the prodomain remains non-covalently associated with the mature active BMP dimer for most BMPs except for BMP2. While most of these complexes are inactive, some, such as BMP7 or BMP9, have been shown to be active [5, 17]. Secreted BMPs transduce their signal via a combination of transmembrane serine/threonine kinase type I and type II receptors. Three type II receptors [Bone Morphogenetic Receptor type 2 (BMPR2), Activin receptor type 2A (ACTR2A) and type 2B (ACTR2B)], and four type I receptors [Activin receptor-Like Kinase (ALK1, ALK2, ALK3 and ALK6)] are involved in BMP signaling [26, 33]. Following ligand-induced receptor hetero-oligomerization, type I receptors are transphosphorylated and activated by type II receptors. These activated receptor complexes phosphorylate the receptor-regulated Smads (R-Smads: Smad1, Smad5 and Smad8), enabling the formation of a complex with the co-Smad, Smad4. R-Smad/Smad4 complexes translocate into the nucleus and regulate target gene expression by binding to regulatory elements and recruiting transcriptional co-repressor and/or activation complexes on their promoters. BMPs can also stimulate non-Smad signaling pathways [26, 33].

BMP9, also known as Growth and Differentiation Factor 2 (GDF2), has recently been brought to the forefront with the characterization of its binding to ALK1 and therefore its functions in angiogenesis [13, 14, 32]. BMP9 was initially cloned from a mouse liver cDNA library [7], and it was shown in rats to be predominantly expressed in the liver by non-parenchymal cells (i.e., endothelial, Kupffer and stellate cells) [24]. BMP9 was first described as a hematopoietic, hepatogenic, osteogenic and chondrogenic factor [6, 21, 30, 34]. It has also been identified as a regulator of glucose metabolism [8], and as a differentiation factor for cholinergic neurons in the central nervous system [22]. Three years ago, we showed that BMP9 binds with a strong affinity to ALK1, a TGF $\beta$  family type 1 receptor that is preferentially expressed by endothelial cells suggesting a role in angiogenesis [14]. And, indeed, it was further demonstrated by others as well as us that BMP9 is a potent regulator of angiogenesis and vascular tone [13, 14, 32, 36]. We also showed that BMP9 is present in human plasma at a concentration of 2–12 ng/mL, which is above its EC<sub>50</sub>, suggesting that circulating BMP9 could play a physiological role on the endothelium [13, 14]. Interestingly, the soluble form of ALK1 has recently been found to

be a powerful inhibitor of angiogenesis and tumor growth [11, 25] and, as such, a new therapeutic target in cancer. As BMP9 is the only known circulating ALK1 ligand, soluble ALK1 probably works by blocking circulating BMP9. Taken together, these data suggest that circulating BMP9 could play a major role in vascular quiescence, but even so not much is known about BMP9 expression.

The aims of the study were therefore to investigate the cellular source of BMP9 in mouse and human and to characterize the biochemical composition of the circulating forms of BMP9. In the present work, we show that BMP9 is predominantly expressed in the liver, and, in contrast to what had been previously described in rats [24], BMP9 is produced by hepatocytes and biliary epithelial cells in human and mouse liver. We also demonstrate that human and murine BMP9 circulates under both an active form (60%) (mature BMP9 associated with its prodomain) and an inactive form (40%) (unprocessed dimeric pro-BMP9) that can be further activated by recombinant furin. Analysis of BMP9 levels in blood during mouse development showed undetectable levels at E9.5, and a high level around birth and during the first 3 weeks (6 ng/mL), which then decreased and remained at a level of around 2 ng/mL throughout adulthood. We also demonstrate that circulating BMP9 induces a constant activation of Smad1/5/8 phosphorylation in endothelial cells, confirming its role as a major factor involved in the control of vascular quiescence.

## Materials and methods

### Blood and tissue donors

Between December 2006 and July 2007, blood samples (7 mL) were taken from 20 healthy volunteers (8 women, 12 men; mean age, 44  $\pm$  10 years) from whom plasmas (K3E tubes; Becton–Dickinson, Pont de Claix, France) were prepared. Plasma aliquots were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Human liver samples for RNA and immunostainings were obtained from histological normal livers taken from patients suffering of metastatic colorectal cancers. Informed consent was obtained from all donors. The investigation conformed to the principles outlined in the Helsinki declaration.

### Animal care

Blood was taken from OF1 mouse embryos, pups and adults into EDTA-coated tubes (Becton–Dickinson) and plasmas were frozen until BMP9 measurement. Inhalational anesthesia with isoflurane was performed before blood puncture. Eight to ten embryos or pups and 3 adult mice were requested for each developmental stage. Wistar female rats were

anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg). Descending thoracic aorta was then quickly excised and fixed in paraformaldehyde 4%. All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals.

### Reagents

Recombinant human BMP9, recombinant human ALK1 extracellular domain-Fc fusion protein (ALK1ecd) and recombinant furin were purchased from R&D Systems (Abingdon, UK). Anti-BMP9 antibodies were purchased from Biogenesis (1406–1460; AbCys, Paris, France) and from R&D Systems (MAB3209, BAF3209, AF3209, AF3879), anti-phosphoSmad1/5/8 antibody was purchased from Cell Signaling Technology (#9511; Danvers, MA, USA).

### Reporter gene constructs

The reporter plasmid pGL3(BRE)<sub>2</sub>-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element [20] was kindly provided to us by Dr P. ten Dijke (Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands). The pcDNA3-derived expression plasmid pALK1 encoding human ALK1 was kindly provided by Dr C. H. Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden). The pRL-TK-luc plasmid encoding renilla luciferase downstream of the thymidine kinase promoter was purchased from Promega (Madison, WI, USA).

### Cell culture

NIH-3T3 fibroblast cells were maintained in DMEM, 4.5 g/L glucose (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as previously described [31].

### Real-time polymerase chain reaction analysis

Total RNA from 20 human tissues was purchased from Clontech (Human total RNA master panel II, batch 1001243A). Total RNAs from the human liver and from the different liver cell subtypes were also obtained from two histological normal biopsies taken from colorectal cancer patients after extraction using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription was performed on 1 µg total RNA with Superscript II-RnaseH reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). We also used cDNA from human hepatocytes, human hepatic stellate cells, human hepatic sinusoidal endothelial cells and human intrahepatic biliary epithelial cells bought from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA). BMP9 quantitative RT-PCR was performed with the Light Cycler-

FastStart Master plus SYBR Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France) on the Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics) using the following primers: 5'-GACGTCC GATAAGTCGACTACGC-3' and 5'-AAGATGTGCTTCT GGAAGGGGAA-3'. The results were normalized to HPRT mRNA expression level using the following primers: 5'-TTG AGC ACA CAG AGG GCT ACA ATG-3' and 5'-ATG GAC AGG ACT GAA CGT CTT GCT-3' or to RPL13a mRNA expression level using the following primers: 5'-TTC CTT GCT CCC AGC TTC CTA TGT-3' and 5'-TTA ATT CCT CAT GCG TTG CCT GCC-3'.

### Immunostaining and image acquisition

Formalin-fixed and paraffin-embedded human and mouse liver sections and rat aorta cross-sections were dewaxed in xylene, rehydrated through graded alcohols to water and then subjected to heat-induced epitope retrieval in sodium citrate buffer in a microwave. The liver sections were stained overnight with anti-BMP9 antibodies (Biogenesis, dilution 1:500, or MAB3209, R&D Systems, dilution 1:50) in Dako Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Denmark). The rat aortic cross-sections were stained overnight with anti-PhosphoSmad1/5/8 antibody (Cell signaling, dilution 1:100) in 5% goat serum. For liver sections using the anti-BMP9 from Biogenesis, immunoreactivity was visualized using EnVision + system horseradish peroxidase kit (Dako) following the manufacturer's instructions. For liver sections using the anti-BMP9 from R&D Systems and aortic cross-sections, immunoreactivity was visualized using ABC reagent and DAB reagent (Vecstatain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were counterstained with haematoxylin and mounted in Fluor Save Reagent (Calbiochem) before microscopy. The slides were observed using a Zeiss AxioPlan light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were captured with a computer-supported AxioCam camera and analyzed using Axiovision 4.7 software (Zeiss).

### Size exclusion chromatography

Amount of 250 µL of plasma or 1 ng of recombinant human BMP9 were run in a final volume of 500 µL (PBS; flow rate: 0.5 mL/min; detector: UV-280 nm) through a Superdex-200 HR 10/30 connected to Fast Liquid Chromatography system (BioLogic; Biorad, Hercules, CA, USA), and 50 fractions of 500 µL were collected. The column was calibrated by successive injections of the following molecular mass markers [Dextran blue (2 GDa); Thyroglobulin (669 kDa); Ferritin (443 kDa); Immunoglobulin (160 kDa); Bovine serum albumin (68 kDa); Carbonic anhydrase (29 kDa); and acetone (0.1 kDa)] all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### ALK1-BRE-luciferase assay

NIH-3T3 cells (70,000 cells/well in 24-well plates) were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) using lipofectamine (Invitrogen) with 0.2 µg of pGL3(BRE)<sub>2</sub>-luc, 0.02 µg of pRL-TK-luc and 0.01 µg of pALK1. Four hours after transfection, cells were treated for 15 h with human recombinant BMP9, or diluted plasma (0.5%), or plasma fractions. Neutralizing anti-BMP9 antibodies (1 µg/mL, AF3209; R&D Systems) were incubated with plasma or fractions when indicated. A standard curve (2.5–40 pg/mL) of recombinant human BMP9 (R&D Systems) was performed. Firefly and renilla luciferase activities were measured sequentially with the Dual-Luciferase reporter assay (Promega). Results are expressed as ratios of firefly luciferase activity over renilla luciferase activity.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

A 96-well microplate was coated with the capture antibody MAB3209 (dilution 1:500; R&D Systems) for the BMP9 ELISA or the capture antibody AF3879 (dilution 1:200; R&D Systems) for the pro-BMP9 ELISA and incubated overnight at room temperature. After blocking for 90 min with 5% BSA in PBS-Tween 20 0.5% and 4 washes (PBS-Tween 20 0.05%), samples were added (100 µL/well) in duplicate for overnight incubation at room temperature. A standard curve (10–640 pg/mL) using twofold serial dilutions of recombinant human BMP9 (R&D Systems) in PBS-Triton 0.5% was performed for the BMP9 ELISA. The washing step was repeated and the detection antibody BAF3209 (dilution 1:500; R&D Systems) was added (100 µL/well) and incubated for 2 h at room temperature. After four washes, incubation with Streptavidin-horseradish peroxidase for 30 min was followed by four washes and the enzymatic activity was detected with Substrate Solution (mixture 1:1; R&D Systems) for 1 h in the dark. The reaction was stopped by adding 100 µL of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Plates were read at 450 and 620 nm wavelengths on a microplate reader (Multiskan EX; Thermo Labsystems). For the pro-BMP9 ELISA, data are presented as optical densities, as recombinant pro-BMP9 was not available as a standard. The following BMPs (BMP10, BMP2, BMP4, BMP5, BMP7, BMP8b, BMP13), prepared at 50 ng/mL, were assayed in the BMP9 ELISA and exhibited no cross-reactivity or interference.

### Albumin removal

Albumin removal and albumin elution were realized using Vivapure Anti-HSA resin following the manufacturer's instructions (Sartorius Biotech, Aubagne, France). Three microliter of plasma were diluted in binding buffer and

added to a Vivaclear spin column containing Vivapure affinity resin for 15 min. The columns were then centrifuged to recover the albumin-depleted sample. Albumin was eluted from the column in 0.1 M Glycine/HCl pH 2.5. These solutions were then gel-filtered on Sephadex G50 column equilibrated in DMEM 4.5 g/L glucose. BMP9 activity was determined using the ALK1-BRE-luciferase assay as indicated above.

### Furin treatment

Plasmas or plasmatic fractions were incubated for 2 h at 30°C in 100 mM Tris, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9.0 in the presence or absence (control) of 0.6 µg/mL of recombinant human furin (1503-SE; R&D Systems). BMP9 concentrations were determined using the ALK1-BRE-luciferase assay and/or the BMP9 ELISA, as indicated above.

### Statistics

Data analysis and statistical tests were performed using unpaired Student's *t* test.

## Results

### Sites of BMP9 expression

Analysis of BMP9 mRNA expression in 20 different human tissues (Total RNA Master panel from Clontech) using HPRT mRNA levels for normalization revealed that BMP9 is mostly expressed in the liver, and also, although at a much lower level, in the brain and the lungs (more than 100-fold less) (Table 1; only 9 tissues are shown, the others did not express BMP9 mRNA). This high level of BMP9 mRNA was confirmed in two other livers obtained from histological normal biopsies taken from colorectal cancer patients (data not shown). Analysis of BMP9 mRNA expression in the different liver cell-types (hepatocytes, hepatic stellate cells, hepatic endothelial cells, and intra-hepatic biliary epithelial cells (all obtained from ScienCell) demonstrated that BMP9 is expressed by hepatocytes and biliary epithelial cells (Table 2). Similar results were obtained from the analysis of isolated cells derived from two histological normal biopsies taken from colorectal cancer patients (data not shown).

To confirm the hepatocyte and biliary epithelial cell BMP9 expression at the protein level, we performed immunohistochemical staining on human liver sections obtained from normal biopsies taken from colorectal cancer patients. We tested several anti-BMP9 antibodies commercially available and two antibodies gave specific BMP9 staining which could be competed by an excess of



**Table 1** BMP9 mRNA expression in nine human tissues

Human tissues	BMP9mRNA/HPRTmRNA <sup>a</sup>
Liver	0.275748
Lung	0.000693
Brain	0.000590
Skeletal muscle	0.000237
Bone marrow	0.000081
Spleen	0.000080
Prostate	0.000052
Small intestine	0.000035
Spinal cord	0.000024

<sup>a</sup> Quantitative RT-PCR analysis of BMP9 mRNA expression in nine human tissues obtained from Clontech performed in duplicates. Results are shown as the mean BMP9 mRNA level normalized to HPRT mRNA levels

**Table 2** BMP9 mRNA expression in the different cell subtypes of human liver

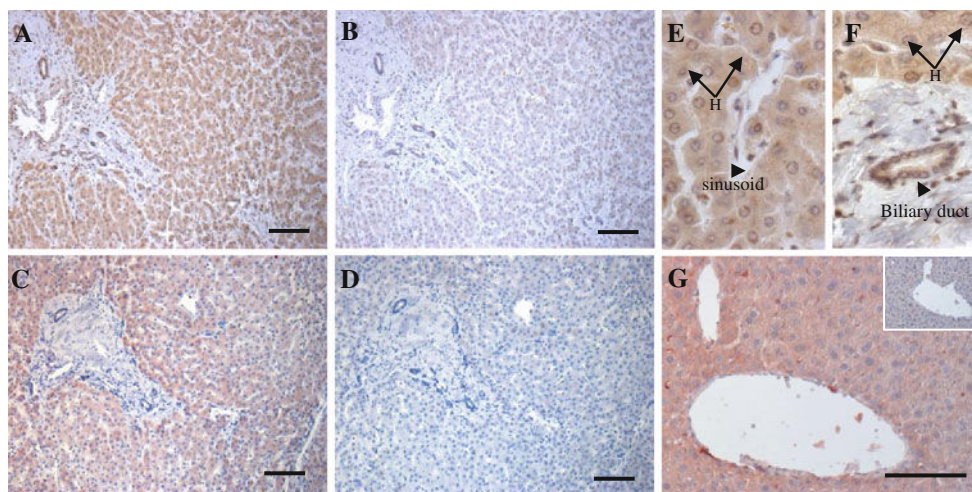
	BMP9mRNA/HPRTmRNA <sup>a</sup>
Intrahepatic biliary epithelial cells	0.038218
Hepatocytes	0.005638
Hepatic stellate cells	0.000343
Hepatic sinusoidal endothelial cells	0.000229

<sup>a</sup> Quantitative RT-PCR analysis of BMP9 expression levels in hepatocytes, hepatic stellate cells, hepatic sinusoidal endothelial cells and intrahepatic biliary epithelial cells obtained from ScienCell performed in duplicates. Results are shown as the mean BMP9 mRNA level normalized to HPRT mRNA levels

recombinant human BMP9 protein (Fig. 1a, c vs. b, d, respectively). Figure 1 shows BMP9 staining in hepatocytes (a, c, e, and f at a higher magnification) and biliary epithelial cells (f) while the blood vessels (sinusoids, large veins and arteries) and the mesenchyme are negative (Fig. 1a, c, and e at a higher magnification). A similar pattern was obtained in mouse liver sections (Fig. 1g, inset corresponds to control IgG).

#### Biochemical characterization of BMP9 circulating forms

BMP9 is synthesized as a precursor protein (pre-pro-BMP9) composed of 429 amino acids (aa) that includes a 22 aa signal peptide, a 297 aa prodomain (33 kDa) and a 110 aa mature protein (12.5 kDa). It is then cleaved by serine endoproteases, leading to a short dimeric mature form of 25 kDa, and the prodomain which can remain non-covalently associated with the mature short form, giving a size of about 100 kDa (Fig. 2a). We first estimated the molecular mass of plasmatic BMP9 through gel permeation chromatography. For this, we applied human plasma onto a Superdex 200 column. After filtration, the BMP9 activity of each fraction was measured using the ALK1-BRE-luciferase assay. BMP9 activity was detected in fractions 33–35 and peaked in fraction 34, corresponding to an approximate molecular mass of  $100 \pm 20$  kDa (Fig. 2b). When we applied recombinant mature BMP9 to this same column, its activity was present in fractions 38–41 and peaked in fraction 40, corresponding to an approximate



**Fig. 1** Origin of BMP9 expression. Immunostaining for BMP9 in human (a–f) and mouse (g, inset corresponds to rabbit control immunoglobulins) liver sections. Human and mouse tissue sections were stained with anti-BMP9 antibodies from R&D Systems (a, b, e, f, g) or from Biogenesis (c, d). The specificity of the staining was checked by addition of an excess of recombinant human BMP9 (1  $\mu$ g/mL) (b, d). Note the strong immunostaining in hepatocytes and

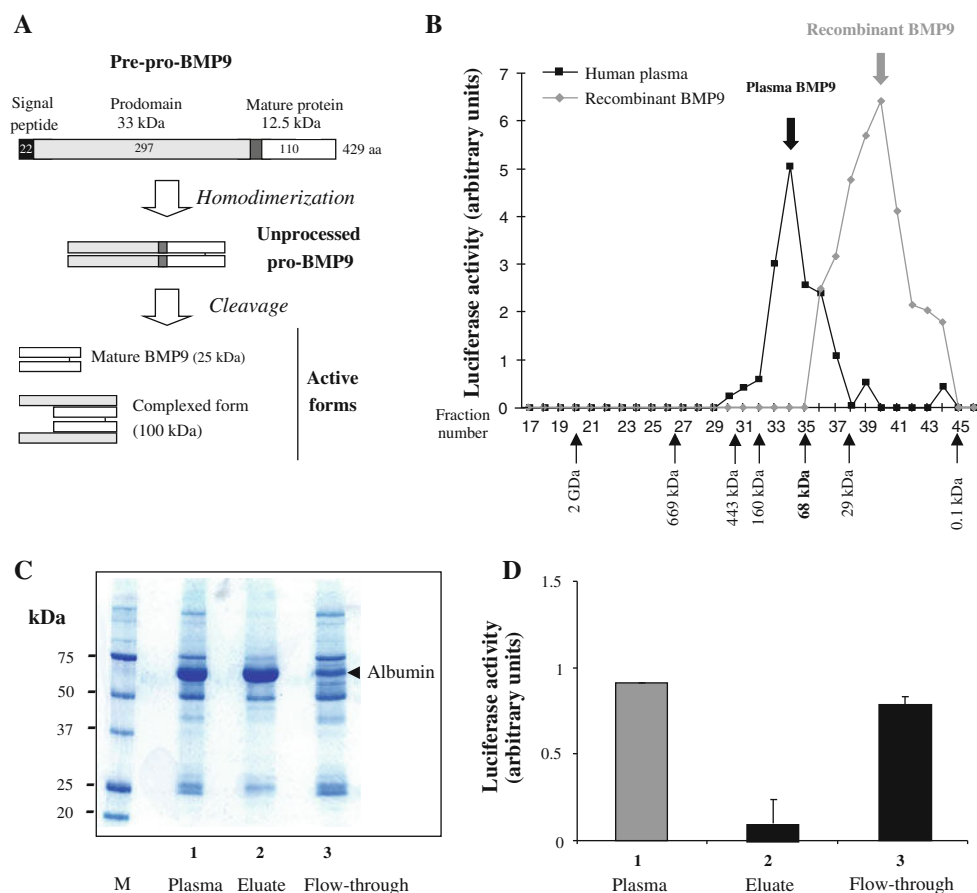
biliary ducts. In e, enlargement of a blood sinusoid [arrowhead indicates absence of staining in liver endothelial cells and arrows indicate staining in hepatocytes (H)]. In f, enlargement of a biliary duct [arrowhead indicates intrahepatic biliary epithelial cells and arrows indicate staining in hepatocytes (H)]. Slides were counter-stained with haematoxylin. Scale bars 100  $\mu$ m

molecular mass of  $25 \pm 5$  kDa. Taken together, these results demonstrated that BMP9 is not circulating as a short mature form of 25 kDa and suggested that BMP9 is associated with other proteins.

As the peak of elution of albumin is centered on fraction 35, i.e., very close to the peak of BMP9 activity, we wondered whether albumin could be associated with BMP9. For this, plasma was depleted of albumin using a Vivapure anti-albumin resin that retained most of the albumin present in the samples, as shown when comparing lane 3 (flow-through) with lane 2 (eluate) and lane 1 (plasma) of Fig. 2c. We then analyzed the BMP9 activity of these fractions. There was no BMP9 activity in the albumin fraction (lane 2) while BMP9 activity was still present in the fraction devoid of albumin (lane 3),

demonstrating that BMP9 is not associated with albumin (Fig. 2d).

The observed molecular mass of the circulating form of BMP9 is around 100 kDa, which could correspond to the complexed BMP9 form [prodomain ( $2 \times 35$  kDa) + mature peptide ( $2 \times 12.5$  kDa)]. To test this hypothesis, we developed an ELISA that can recognize the propeptide complexed to the mature peptide using an anti-human BMP9 propeptide antibody as a capture antibody and a biotinylated polyclonal anti-human mature BMP9 protein as a detection antibody (pro-BMP9 ELISA). Using this ELISA, a peak of immunoreactivity was detectable in the same fractions that were positive in the ALK1-BRE-luciferase assay (33–35), supporting the hypothesis that mature BMP9 circulates as a large complex (the mature

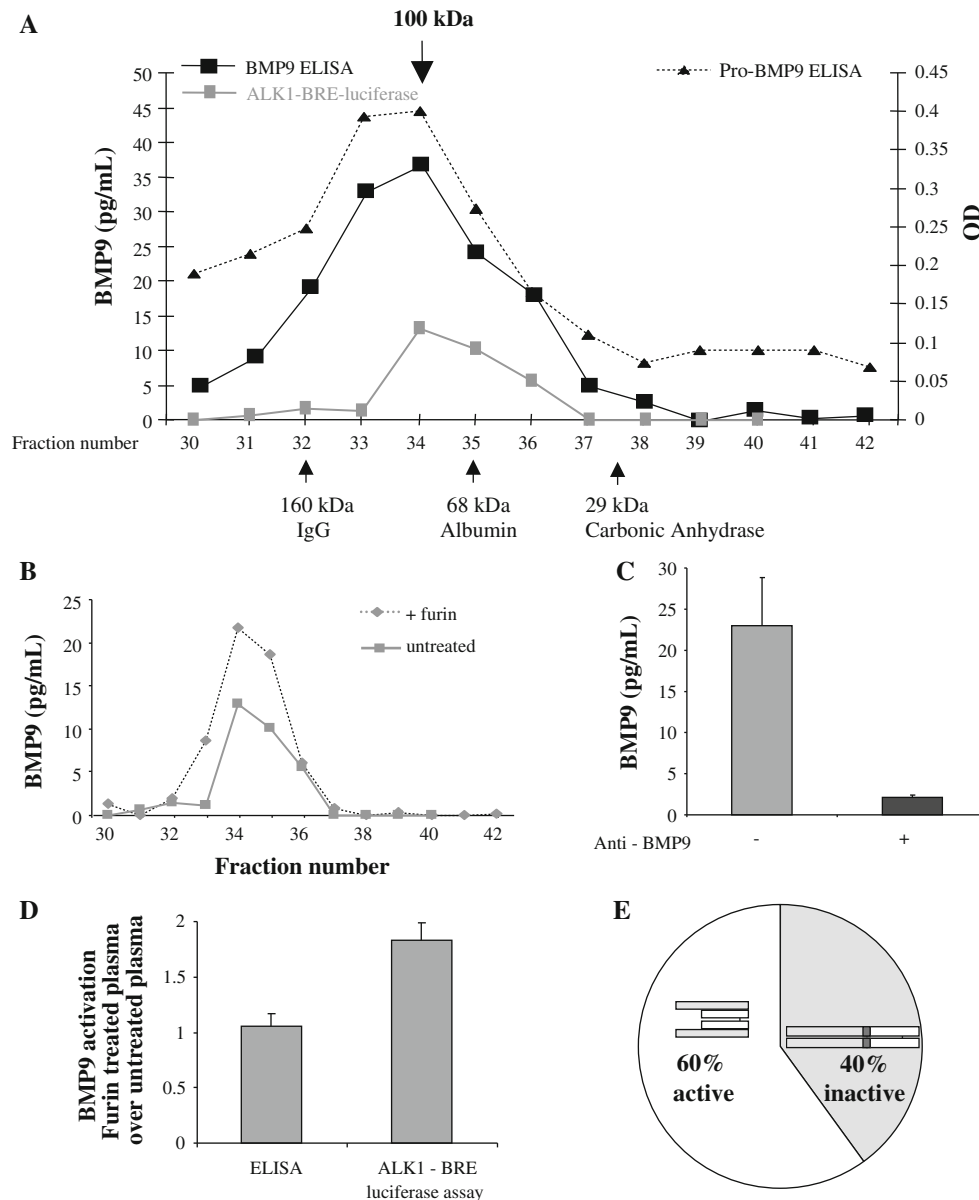


**Fig. 2** BMP9 circulates in plasma under a high molecular mass form. **a** BMP9 biosynthesis. BMP9 is synthesized as a precursor protein (*Pre-pro-BMP9*) composed of 429 amino acids (aa) that include a 22 aa signal peptide, a 297 aa prodomain (33 kDa) and a 110 aa mature protein (12.5 kDa). The *pre-pro-BMP9* then homodimerizes (*pro-BMP9*) and is subsequently cleaved by serine endoproteases. This generates two active forms: the short mature form (25 kDa) and the complexed form (100 kDa) in which the prodomain remains associated with the mature form. **b** Proteins from human plasma were separated by gel filtration chromatography. In a parallel experiment, recombinant human BMP9 was passed onto the same column. BMP9

activity was then measured in the different fractions using the ALK1-BRE-luciferase assay as described in “Materials and methods”. The data from one representative experiment (out of 4) are represented. **c** and **d** Plasma was passed through an anti-human serum albumin column. The plasma (1), the eluate (2) and the flow-through (3) were then analyzed by 10% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue (**c**) and their BMP9 activity using the ALK1-BRE-luciferase assay was also quantified as described in “Materials and methods” (**d**). Data are expressed as the mean luciferase value  $\pm$  SD obtained from two independent experiments

form complexed to its prodomain) (Fig. 3a). We also developed an ELISA using a monoclonal anti-human mature BMP9 antibody as a capture antibody and the

previously used biotinylated polyclonal anti-human mature BMP9 protein as a detection antibody (BMP9 ELISA). Using this ELISA, we also detected circulating BMP9 in



**Fig. 3** BMP9 circulates in plasma under both active and inactive high molecular mass forms. **a** Proteins from a pool of five human plasmas were separated through gel filtration chromatography. BMP9 levels were then measured in the different fractions by three different means: the ALK1-BRE-luciferase assay, the BMP9 ELISA and the pro-BMP9 ELISA as described in “Materials and methods”. The ALK1-BRE-luciferase assay data and the data obtained from the BMP9 ELISA are presented as pg/mL of BMP9. The data obtained with the pro-BMP9 ELISA are presented as optical densities (OD). The data obtained in one representative experiment out of 3 are presented. **b**, **c** Human fractions (30–42) were treated with or without furin and BMP9 levels were then measured in the different fractions with the ALK1-BRE-luciferase assay (fraction 34, corresponding to

the peak of BMP9 activity, was also measured **c** in the absence (gray square) or presence of anti-BMP9 neutralizing antibodies (black square). The ALK1-BRE-luciferase assay data are presented as pg/mL of BMP9. The data obtained in one representative experiment out of 2 are presented. **d** Nine human plasma (0.3%) were treated with or without furin and BMP9 activation was then measured using the ALK1-BRE-luciferase assay and the BMP9 ELISA as described in “Materials and methods”. Data are expressed as furin-treated plasma over untreated plasma mean  $\pm$  SEM from duplicate determinations. **e** Pie chart representing the percentage of each BMP9 complex circulating in human plasma, as calculated from (**d**) measured with the ALK1-BRE luciferase assay



the fractions 33–35 (Fig. 3a) but not in the fractions 38–41 corresponding to the short mature form (Fig. 2b), confirming that there is no free mature BMP9 circulating in plasma.

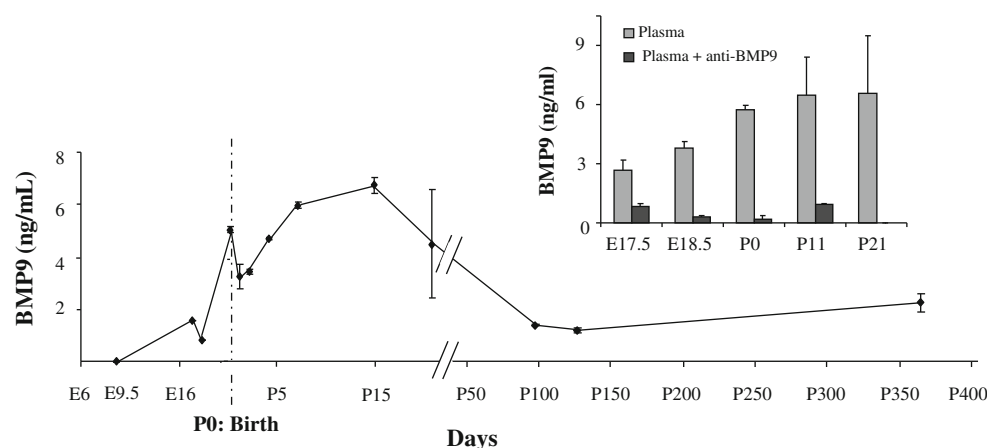
Interestingly, we always measured lower levels of circulating BMP9 using the cellular ALK1-BRE-luciferase assay, which measures only active BMP9, than with the BMP9 ELISA (12.9 vs. 36.9 pg/mL, respectively, calculated from fraction 34 in Fig. 3a). As some members of the BMP family such as myostatin have been shown to be expressed as immature unprocessed proteins [41], we wondered whether BMP9 might be circulating under both an activated form and an inactive unprocessed form. To test this, we used recombinant furin, a member of the proprotein serine endoprotease family that is known to proteolytically process the precursor forms of the TGF $\beta$ /BMP superfamily members [10]. Addition of recombinant furin to the different gel filtration fractions increased the BMP9 activity measured by the ALK1-BRE-luciferase assay (Fig. 3b). This suggested that some BMP9 is circulating as an inactive unprocessed form. To make sure that the increase in the BRE activity measured in presence of furin is due to BMP9, we added neutralizing anti-BMP9 antibody and showed that it completely inhibited this furin-revealed activity, which can therefore be totally attributed to BMP9 (Fig. 3c). Addition of furin to unfractionated plasma also significantly increased the level of active BMP9 measured with the ALK1-BRE-luciferase assay, while it did not change the level of BMP9 measured with the ELISA (Fig. 3d). This allowed us to determine that, in human adult plasma, 60% of BMP9 is circulating under an active complexed form and 40% under an inactive

unprocessed form (Fig. 3e). We were not able to confirm the presence of these two circulating forms by western blot analysis in human plasma due to insufficient sensitivity. However, western blot analysis of the supernatant of 293 cells expressing recombinant BMP9 showed the presence of mature BMP9, BMP9 prodomain, and uncleaved BMP9 (Suppl Fig. 1). These data support that BMP9 can be secreted in an uncleaved form as we show in plasma.

We also analyzed the circulating form of BMP9 in murine plasma. We could show that it also circulates as a large complex, peaking in fractions 33–35, as human plasma (Suppl Fig. 2) and that this large complex could be activated by furin (data not shown). These data suggest that BMP9 circulating forms in human and mouse are identical.

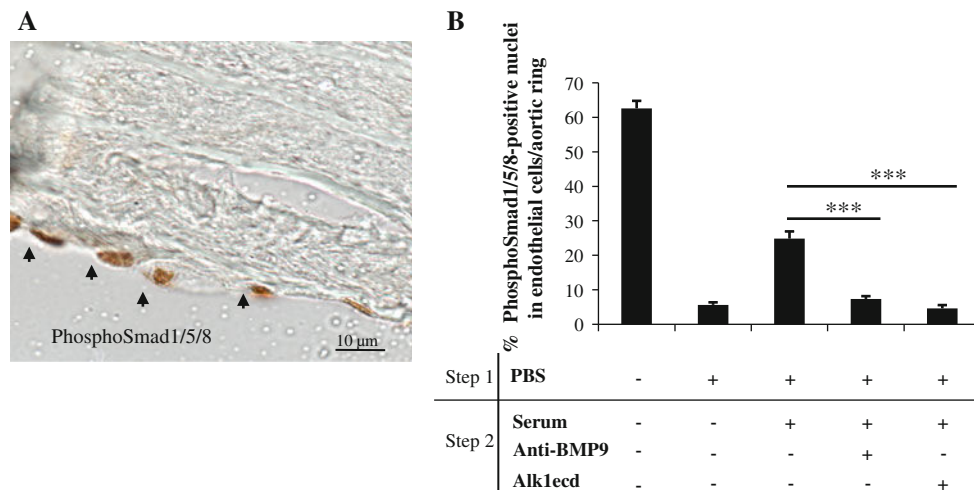
#### Ontogeny of circulating blood BMP9 levels during murine development

We next measured circulating BMP9 levels in mouse plasmas throughout development from embryonic day 9.5 up to adulthood (1 year) using the ALK1-BRE-luciferase assay. For the assay, plasmas were diluted to 0.5% in DMEM. We found that BMP9 was absent from plasma in E9.5 embryos, was present in E17.5 embryos, peaked in newborn mice (6 ng/mL), and remained high for the first three postnatal weeks before decreasing in adult mice (2 ng/mL) (Fig. 4). The use of BMP9 neutralizing antibodies proved that the measured activity is only attributable to BMP9 (inset in Fig. 4). We could further demonstrate that there was no difference in BMP9 circulating levels between males and females, nor any variation during the circadian cycle (data not shown).



**Fig. 4** Ontogeny of BMP9 circulating levels in mice. BMP9 levels were measured from pooled diluted plasma (0.5%) taken from mice at the indicated developmental stages using the ALK1-BRE-luciferase assay as described in “Materials and methods”. In order to check that the activity measured by the ALK1-BRE-luciferase assay was

attributable to BMP9, the assay was performed (*inset*) in the absence (gray squares) or the presence of anti-BMP9 neutralizing antibodies (black squares). The results are presented as means  $\pm$  SD from triplicate determinations (*E* embryonic day, *P* post-natal day)



**Fig. 5** Rat aortic endothelial cells are physiologically Smad1/5/8 phosphorylated in response to circulating BMP9. **a** Immunostaining for phosphoSmad1/5/8 of rat aorta cross-sections. The aortas were fixed immediately after surgical removal from the killed animal and processed for phospho-Smad1/5/8 immunostaining. Note the nuclear staining of endothelial cells. **b** Quantification of the number of phosphoSmad1/5/8-positive nuclei. Rat aortic slices were either fixed immediately after sacrificing the animal or incubated ex vivo for 1 h

with PBS (step 1) and then for another hour with rat serum in the absence or presence of either anti-BMP9 neutralizing antibodies or recombinant ALK1ecd (step 2). The rat aorta slices were then fixed and immunostained for phosphoSmad1/5/8. Results are presented as the percentage of phosphoSmad1/5/8 nuclei in endothelial cells per aortic ring. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of values obtained in 3 independent experiments (\*\* $p < 0.001$ )

Endothelial cells from rat aorta cross sections are Smad1/5/8 phosphorylated by circulating BMP9

We have previously shown that BMP9 is present in human adult plasma at levels (2–12 ng/mL) above its EC<sub>50</sub> (50 pg/mL) for ALK1 [13]. This implies that circulating BMP9 should constantly activate the Smad1/5/8 pathway in endothelial cells. To demonstrate this, we performed immunostaining for phospho-Smad1/5/8 on rat aortic rings fixed immediately after sacrifice. We observed that most nuclei of endothelial cells were positively marked by the anti-phosphoSmad1/5/8 antibody in the rat aortic cross sections (60–80%; Fig. 5a). Interestingly, we could show that ex vivo incubation of this rat aorta section for 1 h in PBS resulted in a strong decrease of phosphoSmad1/5/8 immunoreactivity, whereas subsequent incubation in the presence of serum for 1 h could partially restore it (Fig. 5b). When we added serum together with either a BMP9 neutralizing antibody or recombinant ALK1ecd, this immunoreactivity was not restored (Fig. 5b). Taken together, these data clearly demonstrate that circulating BMP9 induces a permanent physiological activation of the Smad1/5/8 pathway in endothelial cells.

## Discussion

The aim of the present work was to better characterize BMP9 expression in humans and mice. In agreement with a

previous work, reporting that BMP9 expression occurs predominantly in the rat's liver [24], we show here that BMP9 mRNA is predominantly expressed in human and mouse liver tissues. However, in contrast to this previous work [24], we did not detect BMP9 in hepatic endothelial cells nor in hepatic stellate cells but rather in hepatocytes and biliary epithelial cells. As hepatocytes are much more abundant than biliary epithelial cells, our data suggest that hepatocytes are the major cellular source of circulating BMP9. We have previously shown that BMP9 binds with a high affinity to ALK1 [14], which is predominantly expressed on endothelial cells; thus our data would suggest that BMP9 acts mostly in a paracrine manner. ALK1 mutations are linked to a genetic vascular disease named hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), which affects vessels in specific tissues [15]. It is interesting to note that we detected BMP9 mRNA levels in the liver, but also, although to a much lower level, in the lungs and the brain, which are the three tissues that are mostly affected in HHT. This could suggest a local role for BMP9 in the development of the disease. It is also interesting to note that BMP9 mRNA level was 100 times and 10 times less abundant in isolated cells (hepatocytes and biliary epithelial cells, respectively) than in liver tissue (Tables 1 and 2). Similar data were obtained using two different reporter genes for normalization (HPRT and RPL13a, data not shown). These differences might be due to mRNA degradation occurring during cell isolation procedures and could suggest that BMP9 mRNA might have a very rapid

turnover. Further work will be necessary to understand the regulation of BMP9 expression.

The analysis of the BMP9 circulating forms in human and murine plasma by ELISA and luciferase assay after gel filtration demonstrated that BMP9 is circulating as a high molecular mass complex of around 100 kDa. Using an ELISA with an antibody directed against BMP9 prodomain and another antibody directed against BMP9 mature form, we could demonstrate that this 100 kDa complex is composed of BMP9 mature short form and BMP9 prodomain. Further, using the serine endoprotease furin which cleaves the prodomain, we showed that we could increase the level of active BMP9 detected by the luciferase assay without modifying the level of BMP9 detected with the BMP9 ELISA. Taken together, these data suggested that BMP9 circulates as two large complexes. The first complex consists of the short mature BMP9 dimer non-covalently associated to two BMP9 prodomains. The second complex consists of the dimeric uncleaved form of BMP9. Because of the estimated size of the complex, we can rule out that other proteins such as fibrillin or Latent TGF $\beta$  binding protein 1 are associated with mature BMP9, as has been shown for BMP7 [17]. We could also experimentally exclude albumin as a potential binding protein (Fig. 2d). We also found that the addition of recombinant mature BMP9 to plasma did not induce a shift in its apparent molecular mass, suggesting that it does not bind to other circulating plasma proteins (data not shown). This first large complex is biologically active. This result is in accordance with a previous work that described that overexpressed recombinant BMP9 is secreted as a large complex comprising mature BMP9 and its prodomain and that this complex has a similar biological activity to that of mature BMP9 [5]. However, our work demonstrates for the first time that this complex does exist under physiological conditions. The significance of prodomain association lies in the observation that, following secretion, the complex is directly targeted to elements of the extracellular matrix. This has not yet been shown for the prodomain of BMP9 and it will be interesting to know in future if it binds to extracellular matrix proteins. Our data would suggest that it does not, as we find large amounts of circulating soluble BMP9. The second BMP9 circulating form is an inactive unprocessed form. Unfortunately, we were unable to perform western blots directed against BMP9 from plasma. However, we could show that the supernatant of 293 cells expressing recombinant BMP9 contains cleaved and uncleaved forms detected by using antibodies directed at the BMP9 prodomain and BMP9 mature form (Suppl Fig. 1). These two forms had already been shown by Coomassie staining from a supernatant of Chinese hamster ovary cell line expressing recombinant BMP9 [5]. This inactive form can be experimentally cleaved and activated by

recombinant furin, suggesting that circulating inactive BMP9 can be cleaved and activated extracellularly. Although extracellular maturation of TGF $\beta$  ligands is not believed to be the rule, several cases have been reported. Secretion of pro-TGF $\beta$ 1 has been observed in bovine adrenocortical cells [35]. GDF15 was also shown to be secreted as both processed and unprocessed forms [2]. Pro-myostatin has been reported to be secreted by skeletal muscle cells and cleaved extracellularly by furin proteases [1]. Pro-nodal is secreted in a different region of the embryo than the proprotein convertases and therefore first encounter each other in the extracellular space, and this was shown to be a critical step for localized nodal activation and early embryo patterning [3]. Seven members of the proconvertase family have been identified [9]. They have been shown to cycle between the trans-Golgi network and cell surface. Some are secreted and can be found in the extracellular matrix and as such could play a role in the spatiotemporal regulation of BMPs biological activity [37]. The role of this uncleaved inactive circulating BMP9 form is not yet clear. It might render the protein more stable, and/or it might allow its activation to occur locally where secreted proconvertases will be expressed. Our data demonstrate that we have here identified another potential control mechanism that might be important for regulating BMP9 bioavailability.

Analysis of BMP9 blood level during mouse development using the ALK1-BRE-luciferase assay shows that neither circulating BMP9 nor any other BMP activating the Smad1/5/8 pathway is detectable at E9.5 (Fig. 4). This is intriguing as ALK1 deletion is embryonic lethal at E10.5 [29, 38]. This suggests that the ALK1 ligand necessary at this embryonic stage might be stored and act locally. Interestingly, we detected circulating BMP9 at E17.5 and this level increases until birth (6 ng/mL) and remains high during the first 3 weeks after birth. This suggests that high circulating BMP9 might be necessary for post-natal development. In line with this hypothesis, it was recently shown that the blockade of ALK1 signaling resulted in defective vascular and lymphatic development in early postnatal mice [28]. BMP9 circulating levels decrease a few weeks after birth but remain around 2.5 ng/mL, i.e., higher than its EC<sub>50</sub> for ALK1 activation (50 pg/mL). This suggests that endothelial cells are constantly activated by BMP9. This is indeed what we observed when we looked at the Smad1/5/8 phosphorylation status of rat aortic cross-sections. This result is in accordance with a previous work that showed the presence of phosphorylated Smad1/5/8 in endothelial cells from various types of blood vessels [39]. These data further emphasize the role of circulating BMP9 on endothelial cells, which contributes to vascular quiescence in adults. Taken together, our results show that BMP9 is mainly produced by hepatocytes, and that it is circulating as inactive and active complexes controlling endothelial cell activation.

In the present work, we have characterized the circulating forms of BMP9 and developed two assays that allow the measurement of either total BMP9 (BMP9 ELISA) or active BMP9 (ALK1-BRE-luciferase assay) in blood. Other BMPs have been described to be present in human or bovine serum (BMP4 and BMP6) [18, 19]. However, it should be emphasized that, although the ALK1-BRE-luciferase assay allows the detection of all BMPs, as they all activate Smad1/5/8 phosphorylation, performing this assay in ALK1-over-expressing cells with very low quantities of serum or plasma (0.5%) allows the specific detection of BMP9. This is due to the much higher affinity of BMP9 for its receptor ALK1 than that of the other BMPs for their receptors ALK2, ALK3 and ALK6 ( $EC_{50} = 50$  pg/mL for ALK1 and 50 ng/mL for the other ALKs). In the future, it will therefore be very interesting to measure either active or total BMP9 circulating levels and to test whether they can represent biomarkers of the angiogenic response, especially since two recent works support the view that ALK1-Fc is a powerful antiangiogenic agent capable of blocking vascularization [11, 25]. BMP9 measurements could therefore be particularly useful in the follow-up of cancer patients or other vascular diseases (HHT, Pulmonary Arterial Hypertension) treated with anti-angiogenic drugs, as well as in liver diseases, or in other diseases where deregulation of BMP signaling has been shown to lead to pathological consequences [16].

**Acknowledgments** We thank Dr T. Jaffredo (CNRS and UPMC, UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Paris, France) who provided us with mouse embryonic plasma at E9.5.

## References

- Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M (2008) Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283:7027–7035
- Bauskin AR, Jiang L, Luo XW, Wu L, Brown DA, Breit SN (2010) The TGF-beta superfamily cytokine MIC-1/GDF15: secretory mechanisms facilitate creation of latent stromal stores. *J Interferon Cytokine Res* 30:389–397
- Beck S, Le Good JA, Guzman M, Ben Haim N, Roy K, Beermann F, Constam DB (2002) Extraembryonic proteases regulate nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 4:981–985
- Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A (2011) Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* 23:609–620
- Brown MA, Zhao Q, Baker KA, Naik C, Chen C, Pukac L, Singh M, Tsareva T, Parice Y, Mahoney A, Roschke V, Sanyal I, Choe S (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem* 280:25111–25118
- Canalis E, Economides AN, Gazzerro E (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 24:218–235
- Celeste AJ, Song JJ, Cox K, Rosen V, Wozney JM (1994) Bone morphogenetic protein-9, a new member of the TGF- $\beta$  superfamily. *J Bone Min Res* 1:S136
- Chen C, Grzegorzewski KJ, Barash S, Zhao Q, Schneider H, Wang Q, Singh M, Pukac L, Bell AC, Duan R, Coleman T, Duttaroy A, Cheng S, Hirsch J, Zhang L, Lazard Y, Fischer C, Barber MC, Ma ZD, Zhang YQ, Reavey P, Zhong L, Teng B, Sanyal I, Ruben SM, Blondel O, Birse CE (2003) An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol* 21:294–301
- Constam DB, Robertson EJ (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144:139–149
- Cui Y, Jean F, Thomas G, Christian JL (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17:4735–4743
- Cunha SI, Pardali E, Thorikay M, Anderberg C, Hawinkels L, Goumans MJ, Seehra J, Heldin CH, ten Dijke P, Pietras K (2010) Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J Exp Med* 207(85–100):S101–S105
- David L, Feige JJ, Bailly S (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:203–212
- David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige JJ, Bailly S (2008) Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res* 102:914–922
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109:1953–1961
- Dupuis-Girod S, Bailly S, Plauchu H (2010) Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): from molecular biology to patient care. *J Thromb Haemost* 8:1447–1456
- Gordon KJ, Blobe GC (2008) Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782:197–228
- Gregory KE, Ono RN, Charbonneau NL, Kuo CL, Keene DR, Bachinger HP, Sakai LY (2005) The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem* 280:27970–27980
- Herrera B, Inman GJ (2009) A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol* 10:20
- Kodaira K, Imada M, Goto M, Tomoyasu A, Fukuda T, Kamijo R, Suda T, Higashio K, Katagiri T (2006) Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. *Biochem Biophys Res Commun* 345:1224–1231
- Korchynskyi O, ten Dijke P (2002) Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277:4883–4891
- Li JZ, Li H, Sasaki T, Holman D, Beres B, Dumont RJ, Pittman DD, Hankins GR, Helm GA (2003) Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther* 10:1735–1743
- Lopez-Coviella I, Berse B, Krauss R, Thies RS, Blusztajn JK (2000) Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* 289:313–316
- Lowery JW, de Caestecker MP (2010) BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:287–298
- Miller AF, Harvey SA, Thies RS, Olson MS (2000) Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem* 275:17937–17945
- Mitchell D, Pobre EG, Mulivor AW, Grinberg AV, Castonguay R, Monnell TE, Solban N, Ucran JA, Pearsall RS, Underwood

- KW, Seehra J, Kumar R (2010) ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol Cancer Ther* 9:379–388
26. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147:35–51
27. Nelsen SM, Christian JL (2009) Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *J Biol Chem* 284:27157–27166
28. Niessen K, Zhang G, Ridgway JB, Chen H, Yan M (2010) ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood* 115:1654–1661
29. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2626–2631
30. Ploemacher RE, Engels LJ, Mayer AE, Thies S, Neben S (1999) Bone morphogenetic protein 9 is a potent synergistic factor for murine hemopoietic progenitor cell generation and colony formation in serum-free cultures. *Leukemia* 13:428–437
31. Ricard N, Bidart M, Mallet C, Lesca G, Giraud S, Prudent R, Feige JJ, Bailly S (2010) Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood* 116:1604–1612
32. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Lowik CW, ten Dijke P (2007) BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* 120:964–972
33. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P (2009) Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:343–355
34. Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS (1995) Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 136:4293–4297
35. Souchevnikskiy S, Chambaz EM, Feige JJ (1995) Thrombospondins selectively activate one of the two latent forms of transforming growth factor-beta present in adrenocortical cell-conditioned medium. *Endocrinology* 136:5118–5126
36. Star GP, Giovino M, Langleben D (2010) Bone morphogenetic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: A potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res* 80:349–354
37. Tsuji A, Sakurai K, Kiyokage E, Yamazaki T, Koide S, Toida K, Ishimura K, Matsuda Y (2003) Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 1645:95–104
38. Urness LD, Sorensen LK, Li DY (2000) Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1 [In Process Citation]. *Nat Genet* 26:328–331
39. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, Sideras P, ten Dijke P (2002) Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106:2263–2270
40. Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P (2010) BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal* 3
41. Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ (2003) Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15842–15843

## **Supplementary Methods**

### **Size Exclusion Chromatography of murine plasma**

250  $\mu$ l of plasma from C57BL6 mice were run in a final volume of 500  $\mu$ L (PBS; Flow rate: 0.5mL/min; Detector: UV-280nm) through a Superdex-200 HR 10/30 connected to Fast Liquid Chromatography system (BioLogic, Biorad, Hercules, CA). 50 fractions of 500  $\mu$ L were collected. BMP9 levels from the different fractions were measured by the ALK1-BRE-Luciferase assay and the human BMP9 ELISA. Recombinant murine BMP9 (R&D Systems) was used for the standard curve in the two assays. Murine plasma was activated by furin as described for human plasma.

### **Western blot analysis**

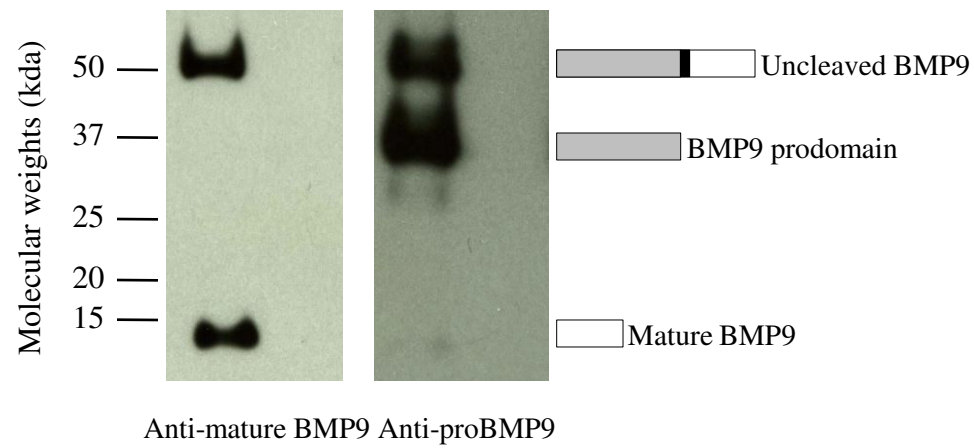
293 cells were transfected with the plasmid pCEP4 (Invitrogen) containing the coding sequence for full-length BMP9 using lipofectamine (Invitrogen). A 48 h supernatant was then TCA (12.5%) precipitated and the proteins were separated by SDS/PAGE Tris-Tricine (11 %) and analyzed by immunoblotting with anti-BMP9 and antipro-BMP9 (R&D Systems, AF3209 and AF3879, respectively).

Legends to Suppl Fig:

Suppl Figure 1: Characterization of the different forms of secreted recombinant BMP9 from 293 cell supernatants. 48h supernatants of transfected and untransfected 293 cells were TCA-precipitated and proteins were resolved by 10% SDS-PAGE, and immunoblotted with antibodies directed against mature BMP9 and the prodomain of BMP9.

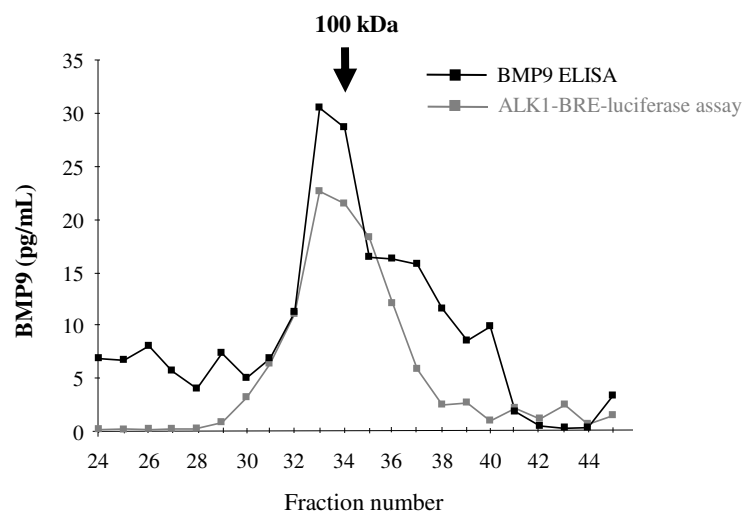
Suppl Figure 2: BMP9 circulates in murine plasma in a high molecular weight form. A: Proteins from a murine plasma were separated through gel filtration chromatography. BMP9 levels were then measured in the different fractions by two different means: the ALK1-BRE-luciferase assay and the BMP9 ELISA as described in Materials and Methods. The ALK1-BRE-luciferase assay data and the data obtained from the BMP9 ELISA are presented as pg/mL of BMP9.







**A**



# Résumé

---

BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) et BMP10 sont deux facteurs de croissance de la famille du TGF $\beta$  qui partagent le fait d'être les ligands du récepteur ALK1 (Activin receptor-like kinase 1). Les mutations de ce récepteur sont la cause de 2 pathologies vasculaires, la maladie de Rendu Osler et l'Hypertension Artérielle Pulmonaire. L'invalidation de *Bmp10* a été décrite, elle entraîne une létalité embryonnaire du fait de graves défauts cardiaques. L'invalidation de *Bmp9*, un facteur de quiescence de l'endothélium vasculaire, n'avait pas encore été réalisée.

Dans ce contexte l'objectif de cette thèse a été d'étudier les rôles respectifs de BMP9 et de BMP10 dans les remodelages vasculaires. Nous avons pour cela utilisé les souris invalidées pour *Bmp9*, obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de S-J Lee (Baltimore, USA).

Bien que les souris *Bmp9*-KO soient viables et fertiles, notre travail montre qu'elles présentent un réseau lymphatique anormal, avec un élargissement des vaisseaux et une réduction du nombre de valves dans leurs collecteurs. Les défauts observés ont un retentissement fonctionnel sur l'efficacité du drainage lymphatique. En accord avec ces observations, nous avons pu montrer que BMP9 régule un certain nombre de gènes impliqués dans le développement du réseau lymphatique.

En contraste avec les résultats précédents, la vascularisation de la rétine est normale chez les souriceaux *Bmp9*-KO. Cette absence de phénotype est causée par une redondance entre BMP9 et BMP10. En effet, la neutralisation de BMP10 chez les souriceaux *Bmp9*-KO entraîne une absence de maturation de la vascularisation de leur rétine. De plus, ces souriceaux présentent un défaut de fermeture de leur canal artériel. Ce vaisseau permet de dévier le sang hors des poumons fœtaux non fonctionnels et sa fermeture au moment de la naissance est nécessaire à la survie postnatale.

L'ensemble de ce travail met en exergue les rôles de BMP9 et de BMP10 dans les remodelages vasculaires périnataux lymphatiques et sanguins.

# Abstract

---

BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) and BMP10 are two growth factors of the TGF $\beta$  family. They are both high affinity ligands for the receptor ALK1 (Activin receptor-like kinase 1), whose mutations are responsible of two vascular pathologies: Rendu-Osler disease and Pulmonary arterial hypertension. *Bmp10* invalidation has been described as embryonically lethal due to serious cardiac defects. BMP9 has been revealed as circulating vascular quiescence factor, but its inactivation has not been described before.

In this context, the aim of my thesis was to evaluate the respective roles of BMP9 and BMP10 in vascular remodeling. We used *Bmp9*-KO mice for this purpose, which were provide by S-J Lee's team from Baltimore (USA).

Although these mice are viable and fertile, we showed that they displayed abnormal lymphatic vessels characterized by vessel enlargement and reduction in number of valves, leading to a decreased lymphatic draining efficiency. Consistent with these data, we showed that BMP9 regulates expression of several genes known to be involved in lymphatic development.

In contrast, *Bmp9* loss-of-function didn't affect blood vessels. We demonstrated that this was due to BMP9 and BMP10 redundancy, as BM10 neutralization in *Bmp9*-KO pups led to a dramatic decrease in retinal vascular expansion. These pups also display an abnormal closure of their ductus arteriosus. This vessel diverts blood away from the non-functional lungs during fetal life and its closure is essential for postnatal survival.

Taken together, our results underlie the implication of BMP9 and BMP10 in lymphatic and blood postnatal vascular remodeling.